

ARTICLE PRINCIPAL

RECOUVRANT EN PARTIE

LA THÈSE DE DOCTORAT ÈS SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-VI

PAR

M^{me} Nicole MICHAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet de la thèse : STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DU MÉRISTÈME
APICAL DES PTÉRIDOPHYTES.

Soutenue le 27 septembre 1971 devant la Commission d'examen.

MM. L. PLANTEFOL *Président.*

R. BUVAT }
M^{me} A. NOUGARÈDE } *Examineurs.*

PARIS

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

1971

ARTICLE PRINCIPAL

RECOUVRANT EN PARTIE

LA THÈSE DE DOCTORAT ÈS SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-VI

PAR

M^{me} Nicole MICHAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

Sujet de la thèse : STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DU MÉRISTÈME
APICAL DES PTÉRIDOPHYTES.

Soutenue le 27 septembre 1971 devant la Commission d'examen.

MM. L. PLANTEFOL *Président.*

R. BUVAT }
M^{me} A. NOUGARÈDE } *Examineurs.*

PARIS

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

1971



Ce travail a pu être réalisé grâce à M^{me} le Professeur NOUGARÈDE qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. Tout au long de mes années de recherches, M^{me} NOUGARÈDE a toujours su trouver le temps de me prodiguer ses conseils, ses critiques et ses encouragements sans lesquels cette thèse n'aurait pu être menée à bien. Que ce soit ici l'occasion de lui exprimer ma profonde reconnaissance et mon sincère attachement.

Je tiens à remercier vivement M. le Professeur PLANTEFOL, membre de l'Institut, qui s'est chargé de présenter mes notes à l'Académie des Sciences et qui a toujours porté beaucoup d'intérêt à mon travail. Je lui suis particulièrement reconnaissante d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

J'ai toujours trouvé auprès de M. le Professeur BUVAT, membre de l'Institut, un grand intérêt pour mes problèmes de recherches ainsi que de précieux conseils. Qu'il soit assuré de ma vive gratitude.

Que M. le Professeur HEIM, membre de l'Institut, reçoive ici mes respectueux remerciements pour l'aide bienveillante qu'il m'a apportée en publiant l'article principal de ma thèse aux *Annales des Sciences Naturelles*.

Je tiens à remercier également tous les membres du laboratoire qui ont contribué par leur amitié à créer une atmosphère de travail agréable. Ces remerciements vont en particulier à mon collègue M. HALLET, à M^{me} HEYNER et à M. MALLARD.

STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DU MÉRISTÈME APICAL DU *PTERIS CRETICA* L. ⁽¹⁾

I. ÉTUDE CYTOLOGIQUE, HISTOCHIMIQUE ET HISTOAUTORADIOGRAPHIQUE

Par M^{me} Nicole MICHAUX

*Laboratoire de Cytologie et Morphogenèse végétales,
bâtiment L, 9, quai Saint-Bernard, 75-Paris, 5^e.*

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	21
HISTORIQUE	22
A. — Embryogenèse, mise en place et fonctionnement du jeune méristème	22
B. — Structure et fonctionnement du méristème apical des plantes adultes	24
MATÉRIEL ET TECHNIQUES	27
A. — Prélèvements	27
B. — Histologie et cytologie en microscopie photonique	28
C. — Cytologie en microscopie électronique	29
D. — Histochimie en microscopie photonique	30
1 ^o Mise en évidence de l'ADN	30

(1) Article principal recouvrant en partie la Thèse de Doctorat ès Sciences naturelles présentée à la Faculté des Sciences de Paris par M^{me} Nicole MICHAUX pour obtenir le grade de Docteur ès-Sciences. Thèse soutenue le 27 septembre 1971, devant la Commission d'Examen : MM. L. PLANTEFOL, *Président*; M. R. BUVAT et M^{me} A. NOUGARÈDE, *Examineurs*. N^o d'enregistrement au C.N.R.S. : A.O.6018.

2° Recherche des ARN	31
3° Mise en évidence de la protéine totale	31
4° Détection des groupements sulfhydriles	32
5° Recherche de l'amidon	35
6° Recherche des lipides	35
E. — <i>Histoautoradiographie</i>	36
F. — <i>Techniques utilisées pour l'obtention des jeunes plantules et pour l'étude de leur méristème</i>	37
G. — <i>Techniques utilisées pour une estimation quantitative de l'activité mitochondriale et de la synthèse d'ADN dans les diverses zones apicales</i>	38
I. — LA PLANTE ADULTE	39
A. — <i>Morphologie</i>	39
B. — <i>Structure du méristème</i>	39
1° Etude histologique	39
2° Etude histochimique	42
a) Les acides nucléiques	42
L'ADN	42
L'ARN	43
b) Les protéines	44
Mise en évidence de la protéine totale	44
Détection des groupements —SH liés aux protéines	46
c) Les composés phénoliques	46
d) L'amidon et les lipides	50
3° Etude cytologique en microscopie photonique et électronique	50
4° Conclusions	57
C. — <i>Fonctionnement du méristème</i>	58
1° Formation et évolution d'un primordium	58
2° Le tissu procambial	64
3° Valeur de la zone d'initiation foliaire ou zone 2	71
4° Résultats histoautoradiographiques	72
a) Incorporation de thymidine tritiée.	72
Comportement des diverses zones du méristème et des cellules de la zone 2 situées à l'aisselle des primordiums de rang n ou n-1. ...	72
Comportement des cellules de la zone 2 situées à l'aisselle des primordiums et ébauches de rang n à n-4	80
Comportement des primordiums foliaires	82
b) Incorporation d'uridine tritiée	84
Comportement des diverses zones apicales	84
Comportement des primordiums foliaires	85
5° Conclusions	86

II. — LE MÉRISTÈME APICAL DES JEUNES PLANTES	87
A. — <i>Morphologie</i>	87
B. — <i>Etude histocytologique de la mise en place du méristème</i>	88
C. — <i>Etude histocytologique du méristème au cours de la formation des feuilles de rang 2 et 3</i>	90
D. — <i>Etude histochimique</i>	94
1° Mise en évidence de l'ADN	94
2° Mise en évidence de l'ARN	95
3° Recherche de la protéine totale	97
4° Recherche des protéines à groupements —SH	97
5° Mise en évidence des composés phénoliques	97
6° Recherche de l'amidon et des lipides	98
E. — <i>Cytologie photonique et électronique</i>	99
F. — <i>Résultats histoautoradiographiques</i>	106
1° Incorporation de thymidine tritiée	106
2° Incorporation d'uridine tritiée	111
G. — <i>Conclusions</i>	112
III. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES	113
A. — <i>Le méristème adulte</i>	113
B. — <i>Le méristème jeune comparé au méristème adulte</i>	114
C. — <i>La cellule apicale</i>	116
1° La cellule apicale du méristème jeune	117
2° La cellule apicale du méristème adulte	118
D. — <i>Le système vasculaire</i>	119
BIBLIOGRAPHIE	122

RÉSUMÉ

Le méristème caulinaire du *Pteris cretica* L., caractérisé par la présence d'une cellule apicale tétraédrique, est constitué par cinq zones histologiques. Des études histochimiques et cytologiques en microscopie photonique et électronique révèlent que la cellule apicale et ses voisines (ou zone 1) possèdent à la fois des caractères de cellules méristématiques typiques et de cellules différenciées. Un gradient progressif de dédifférenciation s'établit depuis la cellule apicale jusqu'à la zone d'initiation foliaire

ou zone 2 d'une part, et depuis la cellule apicale jusqu'à la zone 4 qui constitue un méristème médullaire d'autre part.

Les primordiums foliaires naissent le long de trois hélices foliaires au niveau d'un anneau initial par un processus rapide et superficiel. Après le soulèvement d'un primordium, la régénération apicale est due essentiellement à l'activité des cellules restantes de l'anneau initial.

Les résultats histoautoradiographiques après incorporation de thymidine et d'uridine tritiées ont montré l'existence d'un gradient dans la durée du cycle mitotique et dans le renouvellement de l'ARN. Ce gradient est superposable au gradient de différenciation cytologique.

Le jeune méristème qui s'élabore autour de la cellule apicale déjà formée dans l'embryon se structure dès que la feuille de rang 2 est initiée. Bien que ce méristème soit dans son ensemble moins différencié que celui des plantes adultes, la cellule apicale présente rapidement des caractères particuliers. Cette cellule se divise souvent et ses recloisonnements semblent être en relation avec l'individualisation d'une nouvelle apicale foliaire. Au niveau de l'apicale caulinaire, l'activité mitotique et celle de synthèse d'ADN sont comparables à celles des cellules de la zone 2; mais le renouvellement de l'ARN y est le plus lent.

Sans résoudre totalement le problème posé par la cellule apicale, ces résultats permettent d'émettre et de discuter diverses hypothèses sur le fonctionnement puis sur le rôle joué par cette cellule dans les méristèmes adultes et jeunes.

SUMMARY

The apical meristem of *Pteris cretica* L., which is characterized by an apical cell, has five histological zones. On the basis of histochemical reactions and cytological studies (by light and electron microscope), it is shown that the apical cell and the neighbouring cells (zone 1) both have characteristics of typical meristematic cells as well as differentiated cells. There is a gradient of dedifferentiation proceeding from the apical cell basipetally into the lateral zone (zone 2) and from the apical cell into the central region through zone 3 to zone 4, which is a rib meristem.

Foliar primordia arise along three « hélices foliaires » in an « anneau initial ». Each primordium develops rapidly from a superficial cell. After the primordium has been produced, the meristematic area is again increased by a substantial activity of the remaining cells on the inner edge of the lateral zone. Histoautoradiographic results with H_3 thymidine and H_3 uridine show an increase in RNA turn over and a decrease in the dura-

tion of the mitotic cycle paralleling the gradient of cytological dedifferentiation.

The young meristem which becomes organized from the apical cell in the embryo becomes structured when the second leaf arises. Although this meristem is not as differentiated as the meristem of the adult plant, the apical cell quickly acquires more specialized characteristics. This cell divides frequently, and its divisions often appear to be synchronized with the formation of new foliar apical cells. In the apical cell mitotic activity and DNA synthesis are not very different from that of cells in zone 2, but the RNA turn over is slower.

Although these results do not completely resolve the problem of the apical cell, they permit an evaluation of some hypotheses on the function of the apical cell in adult and young meristems.

INTRODUCTION

Il y a plus d'un siècle, NAEGELI [45] et HOFMEISTER [35] montraient que les méristèmes des Fougères construisent une tige et des feuilles grâce au fonctionnement d'une cellule apicale, particulière par sa forme et par sa taille. Cependant, encore de nos jours, le fonctionnement et le métabolisme des apex des Filicinées sont mal connus et le rôle de la cellule apicale n'est pas compris de la même façon par tous les auteurs.

Durant ces dernières années, pourtant, les investigations nombreuses et précises qui ont été réalisées sur les méristèmes des Végétaux supérieurs ont permis de comprendre d'une façon approfondie leur structure et leur fonctionnement, ainsi que d'atténuer les divergences de vue qui s'étaient violemment fait jour entre plusieurs écoles [47]. La solution des problèmes posés par le fonctionnement apical n'est pas aussi avancée chez les Ptéridophytes, mais ce n'est ni par oubli, ni par manque d'intérêt. En effet, si les méristèmes des Filicinées se révèlent d'une étude techniquement difficile à mener, ils constituent un matériel de choix, par leur structure apparemment plus schématique que celle des Végétaux supérieurs, pour aborder les problèmes généraux de morphogenèse et d'histogenèse. Quelques études cytologiques précises ont été effectuées récemment sur des Lycopodiales [5, 37], des Equisétales [7] et des Hydroptéridales [57] dans le but essentiel d'élucider le rôle de la cellule apicale, mais peu d'auteurs se sont penchés sur les Filicinées. Depuis 1940, en effet, les travaux consacrés aux Filicinées sont dus pour la plupart à WARDLAW et à son école [12, 65 à 82]. WARDLAW considère que la compréhension du fonctionnement apical ne se fera qu'après des recherches conjointes d'histocytologie, de biochimie et de génétique, mais il a toujours envisagé le problème sous l'angle unique de la morphologie expérimentale. Seuls quelques auteurs [11, 19, 56, 60] se sont efforcés de donner, sur la structure des méristèmes de certaines

Fougères, des éléments précis d'histologie et de cytologie, puis d'en déduire leur fonctionnement. Aussi nous a-t-il semblé intéressant d'effectuer sur le méristème du *Pteris cretica* L. les études devenues classiques pour les Végétaux supérieurs. Notre travail comportera donc des données histologiques et cytologiques, en microscopie optique et électronique, mais aussi des examens cytochimiques et histautoradiographiques effectués à la fois sur des apex de plantes adultes, pour étudier leur structure et leur fonctionnement plastochronique et sur de très jeunes sporophytes, afin de comprendre la mise en place du méristème et son évolution tout au long de la vie de la plante.

HISTORIQUE

A. — *Embryogenèse, mise en place et fonctionnement du jeune méristème.*

En 1934, VLADESCO [64] montre, en prenant comme exemple le *Gymnogramme sulphurea*, que chez les Fougères leptosporangiées, dès sa formation, l'œuf subit successivement et dans une orientation déterminée deux cloisonnements (fig. 1 A et B) donnant naissance à un embryon formé de quatre quadrants (fig. 1 B). Cet embryon, au stade « quadrant », ne possède pas de suspenseur, mais le devenir de chacune de ses cellules est déjà déterminé. En effet, au cours du développement, les dérivées de chaque quadrant originel donnent une région précise de la jeune plante (fig. 1 B à D). La première racine, la première feuille ainsi que la cellule apicale de l'axe seraient donc formées directement par un secteur particulier de l'embryon. Mais pour cet auteur cependant, les quadrants n'ont pas toujours une signification organogénique aussi absolue, la cellule apicale de l'axe (fig. 1 D, T) qui provient, en général, de l'accroissement caractéristique d'une cellule du quadrant antérieur-supérieur (fig. 1 B à D) *peut aussi bien provenir de l'accroissement d'une cellule appartenant à un autre quadrant.*

WARDLAW [73], chez le *Dryopteris*, l'*Adiantum*, l'*Onoclea* ou le *Gymnogramme*, GOTTLIEB [26], chez le *Pteridium aquilinum*, et DURAND-RIVIÈRES [19], chez le *Pteris*, souscrivent entièrement à ce schéma de développement.

Des cultures, en conditions aseptiques, de jeunes embryons isolés [19, 73] montrent qu'en l'absence de prothalle, les premières racines des jeunes sporophytes ne se forment pas, alors que les feuilles se développent normalement. DURAND-RIVIÈRES [19] et WARDLAW [73] déduisent de leurs expériences qu'au début de leur développement les jeunes plantes reçoivent du prothalle, entre autres, des substances rhizogènes. Si les différents stades de l'embryogenèse chez les Fougères leptosporangiées sont relativement bien connus et si la causalité du développement des jeunes sporophytes com-

mence à être étudiée, on possède, par contre, peu de données sur la mise en place du méristème apical, sur sa structure et sur le début de son fonctionnement.

GOTTLIEB [26] décrit les jeunes sporophytes de *Pteridium aquilinum*, sans exposer de façon précise la structure du méristème.

GOTTLIEB et STEEVES [28] étudient chez le même genre les variations de structure que subit le méristème lors du développement de la jeune plante en une plante adulte. Ces auteurs constatent que, si tout au long de l'évolution de la plante l'apex augmente de volume, la cellule apicale, au contraire, reste de taille constante. Seul le nombre de cellules prismatiques

FIG. 1.

Schéma illustrant les différents stades d'évolution d'un embryon d'une Fougère leptosporangée (*Gymnogramme sulphurea*), selon VLADESCO [64]. Les tirets et les flèches indiquent le devenir des quatre premières cellules formées.

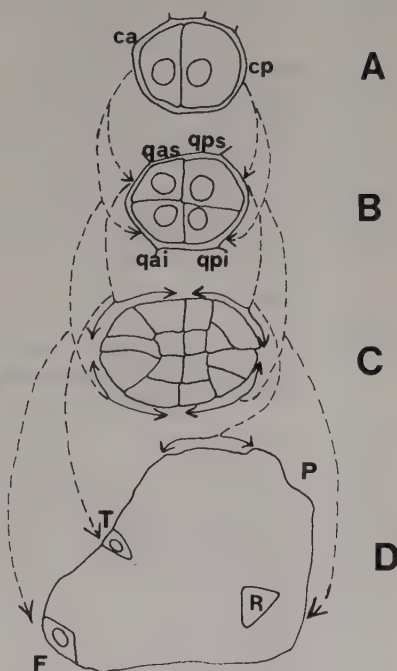
A. Premier cloisonnement de l'œuf délimitant une cellule antérieure (ca) et une cellule postérieure (cp) par rapport au col de l'archégone.

B. Œuf ayant subi deux cloisonnements et formant un embryon au stade « quadrant ». *qai*, quadrant antérieur inférieur; *qas*, quadrant antérieur supérieur; *qpi*, quadrant postérieur inférieur; *qps*, quadrant postérieur supérieur.

C. Embryon pluricellulaire.

D. Embryon dans lequel se sont différenciés : *F*, la cellule apicale de la première feuille; *P*, le pied; *R*, la cellule apicale de la première racine; *T*, la cellule apicale de l'axe.

La flèche indique la direction dans laquelle se situe le point de croissance du prothalle.



qui la bordent augmente. Les tissus corticaux s'accroissent considérablement et tendent à entourer le méristème apical proprement dit.

GIFFORD [23] utilise de jeunes sporophytes du *Ceratopteris thalictroides* pour montrer, à l'aide de méthodes histoautoradiographiques après incorporation de thymidine tritiée, que la cellule apicale du méristème de Fougère synthétise de l'ADN. L'auteur conclut, à partir de ce fait, que l'apicale se divise comme les autres cellules de l'apex. Mais, à notre connaissance, aucun auteur n'a tenté, par des méthodes histologiques et histochimiques, de décrire, chez les Filicinées leptosporangées, la mise en place du jeune méristème et le début de son fonctionnement, ainsi que l'a fait récemment ANDRÈS [1] chez le *Marsilea*.

B. — Structure et fonctionnement du méristème apical des plantes adultes.

Chez les plantes adultes, les descriptions structurales des méristèmes, appuyées sur des observations histologiques et cytologiques précises, sont plus nombreuses. La présence d'une cellule apicale bifaciale ou tétraédrique, en général bien distincte par sa forme et par sa taille, est le seul fait qui soit admis depuis longtemps. Si l'interprétation structurale varie selon les auteurs, c'est parce qu'un même terme est bien souvent employé pour désigner deux régions apicales différentes, mais les fonctionnements envisagés restent très voisins.

Pour GOTTLIEB et STEEVES [28, 29] ainsi que pour DASANAYAKE [17], chez le *Pteridium*, HAGEMANN [32], chez diverses espèces de Fougères, et WARDLAW, chez le *Dryopteris aristata* [68, 69] et chez l'*Asplenium* [75], le méristème (fig. 2, *ma*) n'est constitué que par la cellule apicale et par la couche superficielle de cellules prismatiques

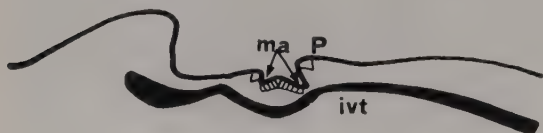


FIG. 2.

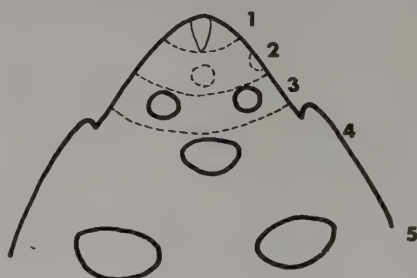


FIG. 3.

FIG. 2. — Schéma de l'extrémité apicale de l'*Asplenium* sp., selon WARDLAW [75]. Le méristème apical (*ma*) n'est constitué que par la cellule apicale et par ses voisines. *ivt*, « incipient vascular tissue », région d'initiation du tissu vasculaire; *P*, primordium.

FIG. 3. — Interprétation schématique de la structure de l'extrémité apicale des Fougères, selon WARDLAW [77].

1, méristème apical ou région distale; 2, région sub-distale; 3, région organogénétique; 4, région subapicale; 5, région de maturation.

qui l'entoure. La cellule apicale est à l'origine de tous les tissus de la plante et en premier lieu d'une organisation en zones spécialisées (fig. 3, 2 à 5) où se préparent (en 2) puis se réalisent (en 3) les phénomènes de morphogenèse et de maturation (en 5).

STEEVES [60] et CROSS [11], chez l'*Osmonde*, SOMA [56], chez le *Dicranopteris dichotoma* et le *Diplopterygium glaucum*, emploient le terme de méristème apical dans un sens beaucoup plus large que les auteurs précédents. Le méristème apical est constitué non seulement par la cellule apicale et par ses dérivées immédiates qui forment une zone appelée :

soit *proméristème* (fig. 4, *pm*), soit *zone de segmentation* (fig. 5, *sz*), mais aussi par les cellules plus latérales donnant naissance aux primordiums et par les cellules sous-jacentes qui évolueront en cellules de moelle ou en cellules vasculaires. Ainsi STEEVES [60] et SOMA [56] décrivent respectivement dans le méristème apical des Fougères quatre (fig. 4) ou trois (fig. 5) zones différentes par l'aspect de leurs cellules, par l'orientation des segmentations et par leur devenir. Mais ces auteurs considèrent, tout comme WARDLAW, que la cellule apicale est à l'origine de tous les tissus de la plante. Enfin d'après KAPLAN [36], le

méristème est constitué par une assise de cellules superficielles qui renferme l'apicale. Cette assise cellulaire est à l'origine d'un méristème sous-jacent dans lequel se différencient les tissus de la tige.

Très peu d'auteurs s'intéressent de façon précise à l'initiation vasculaire au niveau du méristème apical. En 1951, WARDLAW [71] remarque qu'il

n'existe dans la littérature aucune idée générale sur la formation du tissu vasculaire dans les zones apicales et subapicales des méristèmes de Fougères. Cet auteur [65 à 67, 76, 77, 79] (fig. 2) mais aussi plus récemment SOMA [56] (fig. 5) pensent que l'initiation vasculaire débute dans les apex actifs directement sous la cellule apicale au niveau soit de l'« incipient vascular tissue » (zone d'initiation vasculaire) (fig. 2, *ivt*), soit des cellules-mères de la stèle (fig. 5, *ms*). Le tissu vasculaire du rhizome est donc composite, pour WARDLAW, puisqu'il est constitué par le tissu vasculaire de la tige

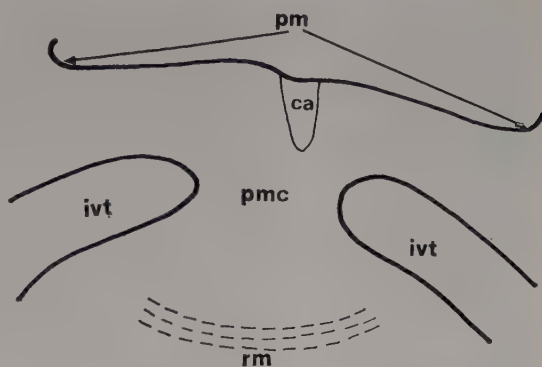


FIG. 4. — Schéma de la structure du méristème apical de l'Osmonde, selon STEEVES [60]. Quatre zones sont reconnaissables : le proméristème (*pm*) qui renferme la cellule apicale (*ca*), les cellules-mères de la moelle (*pmc*) ou « pith mother cells », le méristème médullaire (*rm*) ou « rib meristem » et la région d'initiation vasculaire (*ivt*) ou « incipient vascular tissue ».

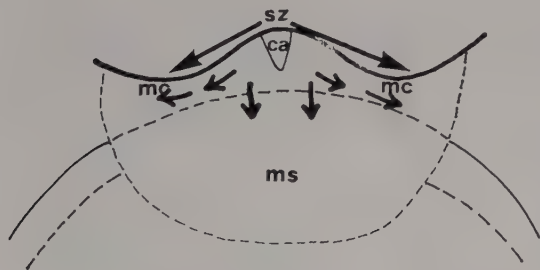


FIG. 5. — Schéma de la structure du méristème apical du *Diplopterygium glaucum*, selon SOMA [56]. Trois zones sont reconnaissables : la zone de segmentation (*sz*) qui renferme la cellule apicale (*ca*), les cellules-mères du cortex (*mc*) et les cellules-mères de la stèle (*ms*).

Les flèches épaisses, tracées à l'intérieur du schéma, indiquent que les dérivées des segmentations de l'apicale sont finalement à l'origine de tous les tissus.

et par les faisceaux provenant des jeunes primordiums. Pour GOTTLIEB [27] et pour GOTTLIEB et STEEVES [28, 29], chez le *Pteridium*, il existe, sous le méristème apical, des cellules *potentiellement vasculaires* formant une zone appelée « zone préstélaire ». Mais le devenir de ces cellules, à l'origine semblables entre elles, n'est pas toujours le même et, chez diverses espèces, certaines de ces cellules *potentiellement vasculaires* évoluent en *cellules de moelle*. Ainsi, chez *Osmunda*, STEEVES [60] ne discerne la région d'initiation vasculaire de WARDLAW (l'« incipient vascular tissue ») que latéralement par rapport à la cellule apicale (fig. 4, *ivt*). Sous l'apicale, on trouve la zone des cellules-mères de la moelle ou « pith-mother cells » (fig. 4, *pmc*); mais, pour cet auteur : « the incipient vascular tissue and the pith-mother cells together constitute the stele in the initial stages of differentiation and may collectively be designated as prestelar tissue ». La stèle, aux premiers stades de sa différenciation, serait donc constituée par « the incipient vascular tissue » et par les cellules-mères de la moelle, l'ensemble formant un *tissu préstélaire*.

VERDOORN [63] considère que la stèle est formée seulement par la réunion des traces foliaires. D'après ESAU [21], le processus d'initiation du procambium chez les Ptéridophytes est tout à fait comparable à celui des Végétaux supérieurs. Le procambium des Fougères serait initié sous forme de faisceaux au sein d'une région méristématique souvent en anneau.

A part l'affirmation retrouvée dans tous les travaux, mais jamais démontrée, selon laquelle la cellule apicale joue un rôle primordial, peu de précisions sont données par les auteurs sur le fonctionnement du méristème. L'école de WARDLAW a tenté d'aborder ce problème par la morphologie expérimentale [68 à 71, 76, 77, 79 à 82]. Cependant, aucune étude de cytologie en microscopie électronique, de cytochimie, d'enzymologie ou d'histoautoradiographie n'a jamais été entreprise sur des méristèmes adultes ou jeunes de Filicinées leptosporangées. Les seuls éléments que les auteurs nous fournissent sur le fonctionnement des méristèmes sont les modalités de la mise en place des primordiums. A ce sujet, deux conceptions s'opposent.

Selon HAGEMANN [32], SOMA [56], GOTTLIEB et STEEVES [29] et DASANAYAKE [17], le primordium foliaire a une origine essentiellement superficielle. Une cellule épidermique prismatique évolue en une apicale foliaire, qui, par des divisions répétées, donne le matériel cellulaire nécessaire à la formation du primordium.

Au contraire, pour WARDLAW [69, 70, 76, 77] et pour STEEVES et BRIGGS [61], l'initiation des primordiums des Fougères serait comparable à celle des Angiospermes. Une dizaine de cellules superficielles, mais aussi un matériel cellulaire provenant des cellules sous-jacentes, seraient à l'origine d'une nouvelle feuille dont l'apicale ne se formerait que plus tard.

Au terme de cette mise au point bibliographique au sujet de l'origine,

de la structure et du fonctionnement du méristème des Filicinées, il ressort qu'un certain nombre de problèmes fondamentaux restent à résoudre :

1° les caractéristiques cytologiques et cytochimiques ainsi que l'ultra-structure des cellules de chacune des zones histologiques;

2° le fonctionnement plastochronique et la mise en place du système vasculaire;

3° les variations du métabolisme de l'ADN et de l'ARN dans les diverses zones méristématiques;

4° la mise en place du méristème dans les jeunes plantes, sa structuration et le début de son fonctionnement;

5° enfin, le rôle joué par la cellule apicale dans le fonctionnement du méristème, adulte ou jeune.

Aussi avons-nous tenté d'aborder ces différents problèmes en prenant comme exemple le *Pteris cretica* L.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Les *Pteris*, provenant des serres d'horticulture et élevés dans les conditions de température, d'humidité et de lumière naturelles, montrent un rythme de croissance différent selon la période de l'année. La croissance est rapide d'avril à novembre, elle se ralentit de décembre à mars. Afin de pouvoir étudier tout au long de l'année des méristèmes fonctionnant activement, ces fougères sont placées dans une serre où les conditions de température, d'éclairement et d'humidité sont les plus favorables à la croissance (température $20^{\circ}\text{C} \pm 2$, humidité 80 %, énergie lumineuse de 8.10^4 ergs/cm²/s, fournie durant 12 heures par des tubes fluorescents, type lumière du jour à émission continue sur toute la longueur du spectre et avec appoint d'énergie dans le rouge orangé). A l'exception de quelques études histochimiques (recherche des composés phénoliques, de l'amidon et des lipides), toutes les expériences ont été réalisées sur des plantes, placées en conditions contrôlées, et à l'état de croissance active.

A. — Prélèvements.

Les méristèmes apicaux du *Pteris cretica* L., débarrassés sous la loupe binoculaire de leurs écailles, sont prélevés soit sur des tiges dressées lorsque les plantes sont encore jeunes, soit à l'extrémité de rhizomes sclérifiés sur les plantes devenues adultes (Pl. I, fig. a). Très souvent, lorsque

les apex sont trop volumineux, afin que la fixation et l'inclusion soient meilleures et que l'orientation des sections soit plus aisée, seule est prélevée la zone centrale, découpée dans un plan convenablement choisi par rapport au dernier primordium formé. Cette technique a été utilisée pour toutes les fixations effectuées en vue d'une étude en microscopie électronique où l'obtention de très petits échantillons est indispensable.

B. — *Histologie et cytologie en microscopie photonique.*

Afin de réaliser sur les méristèmes une étude histologique classique et de repérer les figures de mitoses, le fixateur de NAVACHINE dont la composition est fournie ci-dessous a été utilisé :

acide chromique à 1 %	10 vol.
formol à 40 %	4 vol.
acide acétique cristallisable pur	1 vol.

Après une fixation de 24 heures dans ce mélange, puis un lavage de 24 heures à l'eau courante, les échantillons sont inclus dans la paraffine de point de fusion 62° C, et des sections de 7 μ d'épaisseur sont réalisées. Les préparations, soigneusement déparaffinées, sont mordancées dans une solution d'alun de fer et d'ammonium à 5 % durant 24 heures. Après lavage à l'eau distillée, elles sont traitées pendant 24 heures par l'héματοxyline ferrique de REGAUD préparée selon la méthode classique [39]. Les sections, lavées à l'eau courante, sont différenciées à l'aide d'une solution d'alun de fer et d'ammonium à 2 %. La régression de la coloration est suivie au microscope. Après passage durant quelques secondes dans une solution de rouge de ruthénium pour colorer les lamelles moyennes des membranes, les préparations sont déshydratées et montées au baume du Canada.

Les études cytologiques ont été réalisées sur des échantillons fixés durant quatre jours dans le mélange de REGAUD préparé comme suit :

solution aqueuse de bichromate de potassium à 3,27 % .	11 vol.
solution aqueuse de formol neutre à 30 %	4 vol.

Le fixateur doit être changé chaque jour. Une post-chromisation est effectuée dans une solution de bichromate de potassium à 3 % durant 7 jours. Après un lavage de 24 heures, les échantillons sont inclus dans de la paraffine dont le point de fusion est de 62° C, puis ils sont sectionnés à 5 μ d'épaisseur. Les préparations, déparaffinées, sont lavées à l'eau distillée, mordancées durant 24 heures dans une solution d'alun de fer et d'ammonium à 5 %, lavées à nouveau puis colorées à l'héματοxyline ferrique de REGAUD. Le bichromate de potassium, utilisé lors de la post-chromisation précipite les composés phénoliques. L'étude de la répartition des vacuoles tannifères dans l'apex a donc pu être réalisée.

C. — Cytologie en microscopie électronique.

Les échantillons, les plus petits possibles, sont préfixés durant une nuit dans le mélange suivant :

solution aqueuse de glutaraldéhyde à 25 %	1 vol.
eau bidistillée	1 vol.
tampon cacodylate 0,1 M pH 7,5	4 vol.

Après trois rinçages d'une heure dans le tampon cacodylate, le matériel subit une postfixation au tétr oxyde d'osmium durant 1 heure 30 dans la solution suivante :

tétr oxyde d'osmium à 4 %	1 vol.
eau bidistillée	1 vol.
tampon véronal pH 7,4	2 vol.

Trois bains de lavage à l'eau bidistillée sont effectués pendant 15 minutes, puis une déshydratation est réalisée par passage dans la série des alcools éthyliques. Après une nuit dans l'alcool éthylique absolu, les échantillons sont transférés durant 45 minutes dans un mélange à parties égales d'éthanol absolu et d'oxyde de propylène, puis dans trois bains successifs de 1 heure chacun, d'oxyde de propylène pur. Le matériel est alors plongé dans trois bains successifs de 1 heure chacun, d'oxyde de propylène et de « milieu d'inclusion ». Pour chaque bain, la quantité de « milieu d'inclusion » par rapport à celle d'oxyde de propylène est augmentée. Les trois bains d'imprégnations sont constitués comme suit :

1^{er} bain :

oxyde de propylène	3 vol.
milieu d'inclusion	1 vol.

2^e bain :

oxyde de propylène	2 vol.
milieu d'inclusion	2 vol.

3^e bain :

oxyde de propylène	1 vol.
milieu d'inclusion	3 vol.

Le milieu d'inclusion est constitué par le mélange suivant :

araldite commerciale M.....	50 ml
durcisseur 964	50 ml
phtalate de butyle	5 ml
accélérateur	2,75 ml

Lors de l'inclusion dans les capsules de gélatine remplies de ce mélange, les pièces sont orientées de façon à obtenir les sections les plus longitudi-

nales possibles. La réalisation de coupes semi-fines permet de contrôler, en microscopie optique, si le plan de coupe est satisfaisant. Grâce à l'utilisation de l'ultrotome LKB, des sections sériées ont été réalisées dans la zone de l'apicale. Ces sections recueillies sur des grilles sont contrastées par passage durant 30 minutes dans une solution de permanganate de potassium à 1 % dans l'eau bidistillée. Après deux bains rapides d'eau bidistillée, les grilles sont agitées durant quelques secondes dans l'acide citrique à 0,5 %, puis lavées et séchées.

D. — *Histochimie en microscopie photonique.*

Afin de mettre en évidence les particularités cytochimiques de l'apicale ainsi que celles des cellules de chacune des zones du méristème, plusieurs réactions ont été effectuées.

1° *Mise en évidence de l'ADN.*

La réaction la plus spécifique de l'ADN est la réaction de FEULGEN.

Principe. — Une hydrolyse acide modérée sépare de l'ADN les bases puriques, c'est-à-dire l'adénine et la guanine. La liaison glucosidique des purines avec le radical glucidique est donc rompue. Un tautomère à fonction aldéhydrique est libéré. C'est le groupement aldéhyde, masqué auparavant, qui est responsable de la recoloration de la fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux ou *réactif de Schiff*.

Technique. — Les échantillons sont fixés durant 24 heures par le mélange de HELLY ainsi préparé :

chlorure mercurique	5 g	} Solution A.
bichromate de potassium	2,5 g	
sulfate de sodium neutre	1 g	
eau distillée	100 ml	
formol neutre à 35-40 %		Solution B.

Le mélange, à raison de 9 volumes de A pour 1 volume de B, ne se fait qu'au moment de l'emploi.

Après un lavage à l'eau courante, durant 24 heures, les échantillons sont inclus et sectionnés de manière classique.

Les préparations déparaffinées sont plongées durant 10 minutes dans une solution d'acide chlorhydrique normal à la température constante de 60° C. Cette hydrolyse est brusquement arrêtée par le passage direct dans l'eau distillée froide. Les sections sont alors traitées durant 1 h 30 par le réactif de Schiff réalisé selon la méthode de LISON [39]. Après trois bains

de lavage de 2 minutes chacun dans la solution suivante fraîchement préparée :

bisulfite de sodium à 10 %	10 ml
eau distillée	200 ml
solution normale d'acide chlorhydrique	10 ml

Les préparations sont lavées à l'eau courante, déshydratées puis montées au baume du Canada.

L'ADN est coloré d'une façon plus ou moins intense en rose-violet.

2° Recherche de l'ARN.

Les ARN, présents dans les cellules aux niveaux nucléolaire et cytoplasmique, sont mis en évidence par la technique de BRACHET.

Principe. — Les acides ribonucléiques ont une affinité pour la pyronine du mélange vert de méthyle-pyronine. Mais ce colorant n'est pas spécifique, il peut colorer les composés phénoliques et les mucopolysaccharides, par exemple. Afin de remédier à ce manque de spécificité, certaines sections sont traitées à la ribonucléase. La ribonucléase dégrade l'acide ribonucléique en fragments *solubles* et *dialysables*. La comparaison entre les échantillons traités et ceux non traités par la ribonucléase, puis colorés par le vert de méthyle-pyronine permet donc de localiser exactement les ARN.

Technique. — Les échantillons sont fixés durant 24 heures dans le mélange suivant :

alcool éthylique 95°	85 ml
formol à 40 %	10 ml
acide acétique cristallisable pur	5 ml

Après un lavage de 24 heures, ils sont inclus et sectionnés de façon habituelle. Une partie des préparations est traitée par une solution de ribonucléase à 1/5 000 durant 40 minutes à une température constante de 55° C. Après incubation, toutes les préparations sont lavées et colorées durant 2 heures par une solution de vert de méthyle-pyronine préparée selon la méthode préconisée par LISON [39]. Les sections sont ensuite lavées, puis déshydratées et montées au baume du Canada. Le cytoplasme et les nucléoles sont colorés en rouge plus ou moins intense par la pyronine et la chromatine en bleu vert par le vert de méthyle.

3° Mise en évidence de la protéine totale.

La réaction de MAZIA, BREWERT et ALFERT [41] permet de détecter la protéine totale.

Principe. — Le mélange de bleu de bromophénol et de chlorure mercurique colore les protéines et les peptides non éliminés par les manipula-

tions histologiques. Le chlorure mercurique agit en permettant l'union du colorant avec certains groupements acides des protéines. Cette technique souvent critiquée [39] pour sa non-spécificité doit être utilisée en liaison avec d'autres réactions histochimiques mettant en évidence l'ARN et les protéines à groupements —SH par exemple.

Technique. — Les échantillons sont fixés durant 24 heures dans le mélange suivant :

alcool éthylique à 95°	85 ml
formol à 40 %	10 ml
acide acétique cristallisable pur	5 ml

puis lavés, inclus et sectionnés de manière classique. Après déparaffinage, les préparations sont plongées durant 20 minutes dans le mélange colorant ainsi constitué :

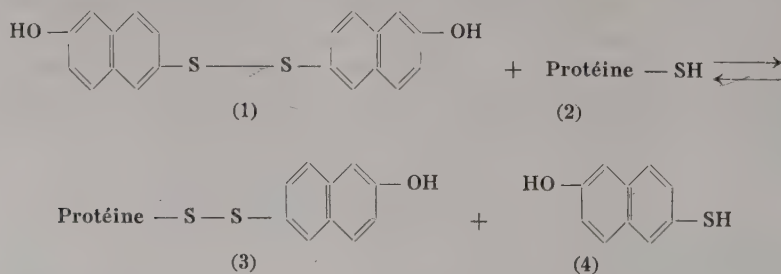
alcool éthylique à 95°	500 ml
chlorure mercurique (Cl ₂ Hg)	50 g
bleu de bromophénol	0,5 g

Après lavage dans une solution d'acide acétique à 0,5 %, les sections sont placées durant 20 minutes dans un tampon phosphate de pH 6,75 afin d'amener le colorant dans sa coloration bleue alcaline. Les préparations déshydratées par deux bains d'alcool butylique sont montées au baume du Canada après trois passages dans le xylène. Le cytoplasme et les noyaux sont colorés en bleu plus ou moins intense.

4° Détection des groupements sulfhydriles.

Afin de mettre en évidence les protéines à groupements —SH, la méthode de BARNETT et SELIGMAN [2] est utilisée.

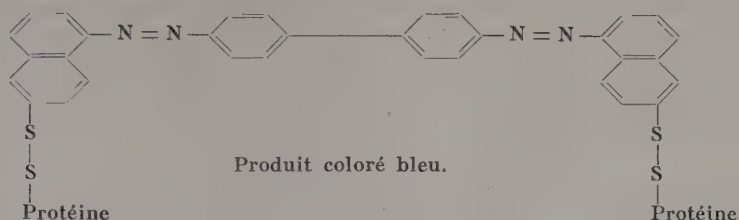
Principe. — Le 2,2'-dihydroxy 6,6'-dinaphtyle disulfure (DDD) (1), utilisé à pH 8,5 donne, avec les groupements —SH des protéines (2) contenues dans les tissus fixés, la réaction d'équilibre suivante :



Ainsi, la molécule du réactif (1) se scinde en deux parties; l'une s'accroche à la protéine par une liaison disulfure (3) tandis que l'autre (4) est libérée

sous forme de 2-dihydroxy-6-naphtythiol. En utilisant un excès de DDD, l'équilibre peut être totalement déplacé vers la droite.

Le produit d'oxydation (3), thioéther incolore, est ensuite converti en un composé azoïque, coloré par couplage avec un sel de diazonium : la diortho-anisidine tétra-azotée. Le résultat de la réaction de couplage est le suivant :



La coloration obtenue est bleue si deux molécules de protéines sont couplées, rose si une seule molécule de protéine intervient. La coloration rose se développe dans les tissus pauvres en $-SH$ où les groupements sulfhydryles sont trop éloignés les uns des autres.

Le produit d'oxydation (3), incolore, est insoluble dans l'eau, dans l'éther et dans l'alcool. Le DDD (1) et le composé (4), solubles dans l'éther et dans l'alcool, sont éliminés des tissus par ces solvants, utilisés avant le traitement par le sel de diazonium.

Technique. — Les échantillons sont fixés pendant 24 heures dans la solution saturée alcoolique d'acide trichloracétique suivante :

alcool à 80°	100 ml
acide trichloracétique	1 g

Ce mélange fixateur assure, *in situ*, la précipitation des protéines cellulaires tout en conservant intégralement leur teneur totale en $-SH$. Le matériel est lavé puis sectionné de manière habituelle. Les préparations déparaffinées sont rincées à l'eau distillée et placées à l'étuve durant 1 heure à la température constante de 50° C dans la solution obtenue en ajoutant quantitativement les deux mélanges suivants :

1° *Solution alcoolique de DDD :*

2,2'-dihydroxy 6,6'-dinaphtyle disulfure	0,05 g
alcool éthylique absolu	30 ml
<i>volume</i>	30 ml

2° *Tampon véronal de Michaelis à pH 8,5 :*

acide chlorhydrique 0,1 N	15,5 ml
véronal sodique (soit 10,308 g pour 500 ml d'eau distillée bouillie et refroidie)	84,5 ml
<i>volume</i>	100 ml

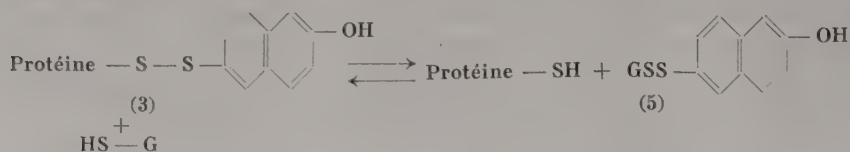
Après refroidissement, les préparations sont lavées durant 10 minutes dans deux bains d'eau distillée, acidifiée à l'acide acétique. Ce lavage transforme le sel de sodium du 2,2'-dihydroxy-dinaphtyle disulfure et celui du 2-hydroxy-6-naphtyl-thiol en naphthols libres, pouvant être extraits par les solvants organiques. Les préparations sont passées par la série des alcools jusque dans l'alcool éthylique absolu. Elles sont ensuite plongées durant 5 minutes dans l'éther absolu. L'excès de DDD et le produit (4) sont ainsi extraits. Après un nouveau lavage à l'eau distillée, les préparations sont traitées pendant 2 minutes dans la solution colorante ci-dessous :

diortho-anisidine tétra-azotée	0,1 g
tampon phosphate de Sörensen à pH 7,38	100 ml

Le montage s'effectue au baume du Canada après déshydratation. Le cytoplasme et le noyau sont colorés en rose ou en bleu.

Principe de la méthode qui assure la spécificité de la réaction. — La spécificité de la réaction peut être vérifiée de la façon suivante :

Après l'action du DDD, donc après la transformation des protéines à groupements —SH en thioéther incolore (3), du glutathion réduit est introduit dans le milieu. La présence de ce tripeptide, à groupement —SH, renverse l'équilibre de la réaction :



Les protéines —SH sont reformées. Comme la plupart des radicaux naphthols, liés après le bain de DDD aux protéines —SH originelles, sont repassés en solution en se combinant chimiquement au glutathion réduit, la coloration est inhibée.

Technique. — Les préparations qui ont subi le traitement au DDD sont lavées à l'éthanol et à l'éther afin d'éliminer l'excès de DDD, ainsi que le sous-produit (4), formé au cours de la réaction. Elles subissent ensuite une incubation durant 3 heures à 50° C dans une solution de glutathion 0,03 M à pH 8 préparée comme suit :

Glutathion sous forme réduite	0,922 g
tampon de Michaelis {	
véronal sodique M/10	85 ml
acide chlorhydrique N/10 ..	15 ml

Au sortir du bain de glutathion réduit, les préparations sont lavées rapidement à l'eau distillée. Cette opération élimine complètement la substance (5) qui s'est développée durant l'incubation.

Comme précédemment, un bain dans la solution colorante de diortho-anisidine tétra-azotée est effectué.

5° Recherche de l'amidon.

Cette étude a été réalisée sur des méristèmes de plantes cultivées au laboratoire. Des prélèvements ont été effectués au cours des mois de croissance active (d'avril à novembre) et des mois de croissance ralentie (de décembre à mars).

La réaction très spécifique à l'acide periodique Schiff, nommée réaction P.A.S., a été utilisée.

Principe. — L'acide periodique attaque le groupement α -glycol des polysaccharides en les transformant en dialdéhydes. Cette oxydation s'effectue rapidement à la température ordinaire et en milieu modérément acide. A condition que le temps d'action soit court, elle ne va pas plus loin que le stade aldéhyde. Les radicaux aldéhydes, mis en évidence, recolorent la fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux ou réactif de Schiff.

Technique. — Les échantillons sont fixés durant 24 heures dans le mélange suivant :

alcool éthylique à 95°	85 ml
formol à 40 %	10 ml
acide acétique cristallisable pur	5 ml

puis lavés, inclus et sectionnés selon les techniques classiques. Après déparaffinage, les préparations sont plongées durant 5 minutes dans une solution d'acide periodique à 0,5 %. Une fois cette hydrolyse réalisée, les sections sont lavées à l'eau distillée, puis traitées durant 15 minutes par le réactif de Schiff. Afin d'éviter que la fuchsine régénérée ne se forme après un transfert direct dans l'eau, et ne colore divers éléments de la préparation, les sections sont rincées durant 2 minutes dans trois bains d'acide sulfureux préparés comme suit :

solution d'acide chlorhydrique normal .	10 ml	} Diluer avec de l'eau distillée jusqu'à 200 ml.
bisulfite de sodium à 10 %	10 ml	

Après lavage à l'eau courante, les sections sont déshydratées, puis montées au baume du Canada.

Les polysaccharides sont colorés en rouge pourpre.

6° Recherche des lipides.

Cette étude a été également réalisée sur des méristèmes de plantes cultivées au laboratoire. Les prélèvements ont été effectués durant les périodes de croissance active (d'avril à novembre) et de croissance ralentie (de décembre à mars).

Principe. — Les substances « lysochromes », capables de colorer des constituants cellulaires en s'y dissolvant, sont employées pour la détection

des lipides. Parmi les nombreux colorants des lipides, le noir Soudan B a été utilisé.

Technique. — Les échantillons sont fixés durant 18 heures par le mélange de MEVES ainsi constitué :

acide chromique à 1 %	13 ml
tétroxyde d'osmium à 2 %	4 ml

Après une postchromisation de 8 jours, à froid, dans une solution de bichromate de potassium à 3 %, puis de 48 heures, à chaud, dans une solution de bichromate de potassium à saturation, les échantillons sont lavés, inclus et sectionnés de manière classique. Les préparations déparaffinées sont transférées dans l'éthanol à 55° durant 30 minutes, puis colorées durant 45 minutes dans une solution à saturation de noir Soudan B dans l'éthanol à 55°. Après lavage à l'eau distillée, les sections sont montées dans de la glycérine gélatinée. Les lipides sont colorés en noir.

E. — *Histoautoradiographie.*

L'étude du métabolisme des acides nucléiques dans les divers territoires apicaux et la recherche de la durée du cycle mitotique de la cellule apicale ont été abordées par les techniques histoautoradiographiques.

Deux précurseurs des acides nucléiques ont été utilisés :

— la thymidine, désoxyribonucléoside de la thymine, base pyrimidique spécifique de l'ADN, marquée au tritium sur son groupement méthyle —CH₃;

— l'uridine, ribonucléoside de l'uracile, base pyrimidique spécifique de l'ARN, marquée au tritium sur le groupement —CH en position 5 du noyau pyrimidique.

Afin de faciliter l'incorporation, un mouillant, le tween 20, a été adjoint aux précurseurs à la concentration de 0,1 %.

La thymidine tritiée, d'activité spécifique 4 Ci/mM, a été fournie à la plante entière durant des temps variant de 8 à 30 heures, à une concentration de 30 μ Ci/ml. Plusieurs méthodes d'incorporation ont été tentées : application d'un coton imprégné de substance marquée sur l'apex disséqué; immersion dans la solution radioactive du méristème isolé de la plante et dégagé ou non de ses écailles. La meilleure technique, bien qu'elle ne donne pas de résultats constants, est une absorption par les racines et par l'apex bien disséqué et *non isolé* du rhizome rampant ou de la tige dressée.

Après l'incorporation, un lavage soigneux est effectué avec une solution de thymidine non radioactive, dix fois plus concentrée que celle du précurseur tritié utilisée pour le marquage. Ce lavage a pour but de diluer le marqueur et d'arrêter ainsi toute incorporation. Aussitôt après ce lavage,

les méristèmes sont prélevés et fixés par le mélange formol - éthanol - acide acétique, puis lavés, inclus et sectionnés à $5\ \mu$ d'épaisseur. Une fois déparaffinées, les préparations sont recouvertes d'une émulsion sensible aux rayonnements β (Kodak, AR 10). Après une exposition de 8 à 10 jours à 4°C à l'obscurité, le film est révélé. Les préparations sont ensuite colorées par le bleu d'azur B. Les images histautoradiographiques obtenues permettent de préciser les lieux d'incorporation du précurseur radioactif et par là même la localisation des synthèses nucléiques qui ont eu lieu au cours du temps de contact avec le traceur.

L'uridine tritiée (activité spécifique 4 Ci/mM) est fournie à la plante entière durant 3 heures, de la même façon que la thymidine tritiée à une concentration de 30 $\mu\text{Ci/ml}$. Un lavage soigneux est effectué avec une solution d'uridine non radioactive, dix fois plus concentrée que celle du précurseur tritié afin d'arrêter toute incorporation. La fixation intervient soit à la fin de la période d'incorporation, soit 2 heures, 5 heures ou 9 heures après la fin de cette période. Pour éviter toute dessiccation, les méristèmes sont recouverts, pendant ce laps de temps, d'un coton imbibé de solution de Knop. Cette méthode permet de suivre la migration du traceur.

F. — Techniques utilisées pour l'obtention des jeunes plantules et pour l'étude de leur méristème.

Les études de la mise en place du méristème, de sa structure et de son fonctionnement chez le très jeune sporophyte ont été réalisées à partir de jeunes plantes formées sur des prothalles issus de spores. Ces spores ont été cultivées sur milieu liquide en conditions aseptiques.

Récoltées à partir des sporanges groupés en spores ourlant la face inférieure des feuilles adultes, les spores sont plongées dans une solution de glucose à 1 %. Cette suspension est filtrée sur du coton de verre afin d'éliminer les déchets de feuilles et de sporanges. Le filtrat obtenu ne contient que des spores en suspension. Ces spores sont alors stérilisées par l'adjonction, dans la suspension, d'une solution d'hypochlorite de calcium à 5 % durant quelques secondes. Toutes les manipulations ultérieures s'effectuent dans une boîte à gants, aseptisée aux rayons ultraviolets, la verrerie utilisée étant préalablement stérilisée par passage au four Pasteur durant 1 heure à 180°C . La suspension de spores est filtrée. Les spores sont lavées deux fois par une solution de glucose à 1 % qui inactive l'hypochlorite puis elles sont remises en suspension dans l'eau stérile, et réparties, à l'aide d'une seringue, dans de petits flacons d'Erlenmeyers contenant le milieu de culture suivant :

solution de Knop diluée au 1/4	1 l
oligo-éléments de Berthelot	1 ml
chlorure d'ammonium	0,05 g

L'eau distillée utilisée, la solution glucosée de lavage et le milieu de culture sont préalablement stérilisés par un séjour à l'autoclave durant 30 minutes à 120° C.

Afin que les spores ne tombent pas toutes au fond de la solution, ce qui favorise la production de prothalles filamenteux anormaux, les erlenmeyers sont remplis jusqu'au niveau d'affleurement du liquide, par de petits cailloux préalablement stérilisés qui retiennent les spores en surface.

Les cultures sont soumises à une température constante de 20° C $\pm$ 2 et à une énergie lumineuse de 8.10^4 ergs/cm²/s fournie chaque jour durant 20 heures par des tubes fluorescents type lumière du jour à émission continue sur toute la longueur du spectre et avec appoint d'énergie dans le rouge orangé. Dans ces conditions, les prothalles deviennent visibles 6 semaines après la mise en culture des spores et les jeunes sporophytes environ 8 semaines après.

Les études histocytologiques et cytochimiques sont réalisées sur les méristèmes des jeunes plantes par les mêmes techniques que pour les plantes adultes. Les précurseurs marqués sont directement ajoutés au milieu de culture, la concentration en thymidine tritiée ou en uridine tritiée étant toujours de 30 μ Ci/ml. La thymidine tritiée est appliquée durant des temps variant de 3 à 21 heures. Les jeunes sporophytes traités sont ensuite lavés par une solution de thymidine non radioactive dix fois plus concentrée que celle du précurseur radioactif afin d'arrêter l'incorporation, puis fixés.

L'uridine tritiée est ajoutée au milieu de culture durant 30 minutes ou 2 heures. Après ces temps d'incorporation, les jeunes plantes sont abondamment lavées avec une solution d'uridine non radioactive dix fois plus concentrée que celle du marqueur, puis fixées ou bien remises sur le milieu de culture originel durant 1 heure, 4 heures ou 10 heures avant la fixation afin d'étudier la migration du traceur.

*G. — Techniques utilisées pour une estimation quantitative
de l'activité mitotique et de la synthèse d'ADN
dans les diverses zones apicales.*

1° Pour chaque méristème, les relevés mitotiques sont réalisés sur les trois sections longitudinales les plus axiales de 7 μ d'épaisseur. L'examen histologique permet de délimiter les cinq régions apicales dans lesquelles les noyaux en mitose et les noyaux au repos sont dénombrés. Les données numériques sont établies sur vingt échantillons pour les méristèmes adultes, pour les jeunes méristèmes, constitués par un nombre plus restreint de cellules, elles le sont sur trente échantillons. Les pourcentages des noyaux en mitose sont alors calculés pour chacune des zones apicales.

2° Les dénombrements de noyaux marqués sont effectués sur les

trois sections longitudinales les plus axiales (de 5 μ d'épaisseur) de méristèmes traités par la technique histoautoradiographique. Pour chacune des cinq zones histologiques, les noyaux marqués et non marqués sont dénombrés. Les pourcentages de noyaux marqués sont calculés à partir de vingt échantillons pour les apex adultes, de trente échantillons pour les jeunes apex. Afin de déterminer si les différences enregistrées entre les pourcentages de noyaux marqués dans les diverses zones apicales peuvent être ou non considérées comme statistiquement valables, la méthode du χ^2 a été utilisée.

I. — LA PLANTE ADULTE

A. — *Morphologie.*

Après la construction d'une vingtaine de feuilles, le méristème occupe l'extrémité large et aplatie d'un rhizome rampant, épais, court et sclérifié (Pl. I, fig. a, *m*). Les feuilles (Pl. I, fig. a, *f*) se dressent sur la face dorsale de ce rhizome, alors que les racines sont apparemment situées sur la face ventrale (Pl. I, fig. a, *ra*). L'étude d'une section transversale, effectuée au niveau du méristème (Pl. I, fig. b) montre que les jeunes primordiums foliaires sont régulièrement formés tout autour de l'aire apicale; les feuilles sont donc normalement disposées autour de la « tige » souterraine, mais elles ont un phototropisme positif et celles qui ont été initiées sur la partie ventrale du rhizome s'infléchissent autour de celui-ci pour se diriger vers la lumière (voir Pl. I, fig. a, *grande flèche*). Deux racines se forment de chaque côté des jeunes ébauches enroulées en crosse et à leur base. La répartition des racines autour de la « tige » est donc en relation étroite avec celle des feuilles, mais les racines ont un géotropisme positif et elles s'incurvent autour du rhizome pour s'enfoncer dans le sol (voir Pl. I, fig. a, *petites flèches*). La séparation des feuilles et des racines sur le rhizome simule donc une symétrie dorsiventrale qui n'est qu'apparente.

B. — *Structure du méristème.*

1° *Etude histologique.*

Le méristème apical se présente, en section transversale, comme une petite masse circulaire (Pl. I, fig. b, *A*) formée de grandes cellules *prismatiques* avec, en son centre, une cellule apicale aisément repérable par sa forme triangulaire et par sa grande taille. Ce massif est entouré par des primordiums et par des jeunes ébauches foliaires (Pl. I, fig. b, *n+1* à *n-7*) qui ont entre elles un angle de divergence de 144° environ. Les jeunes

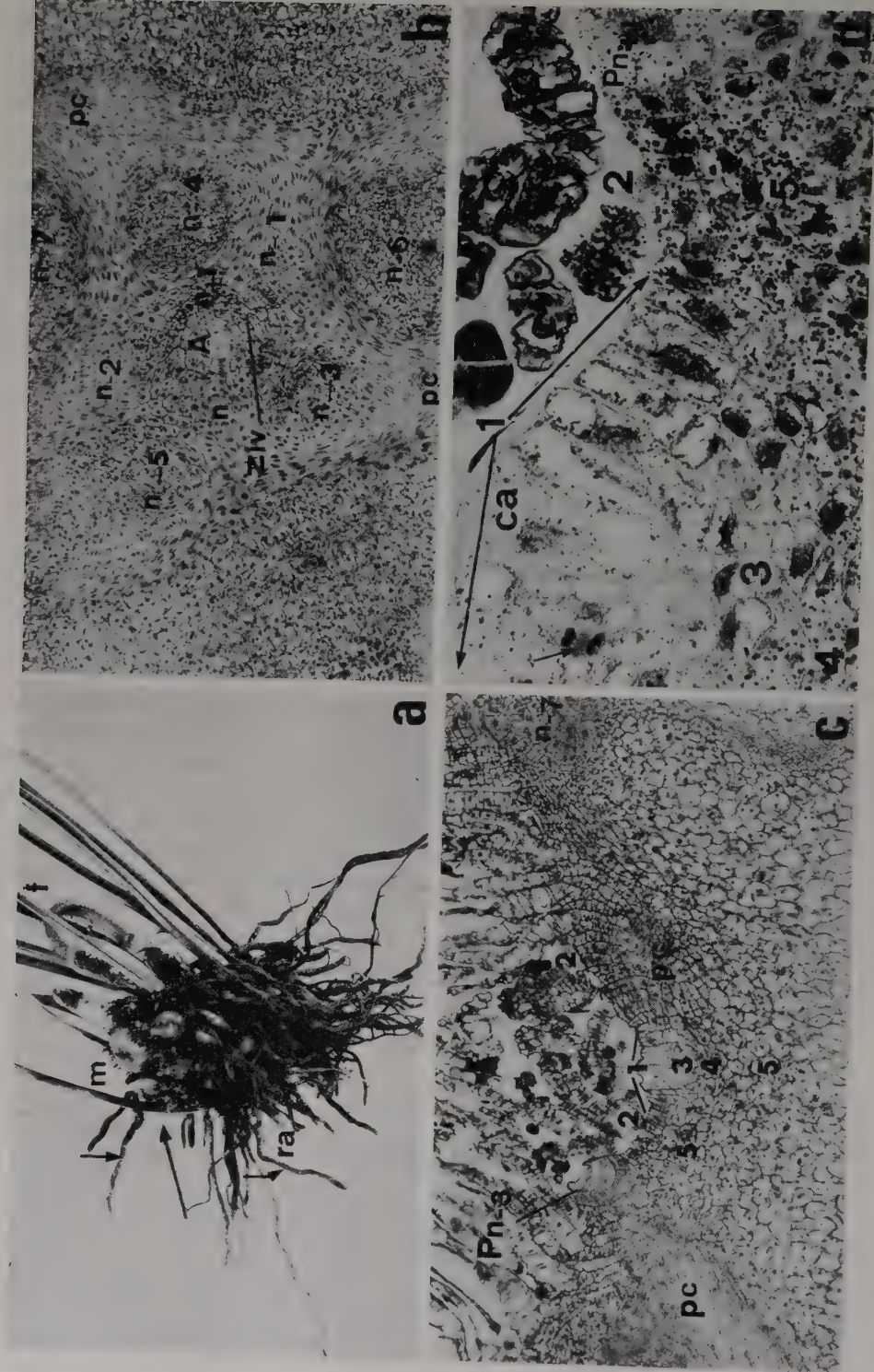


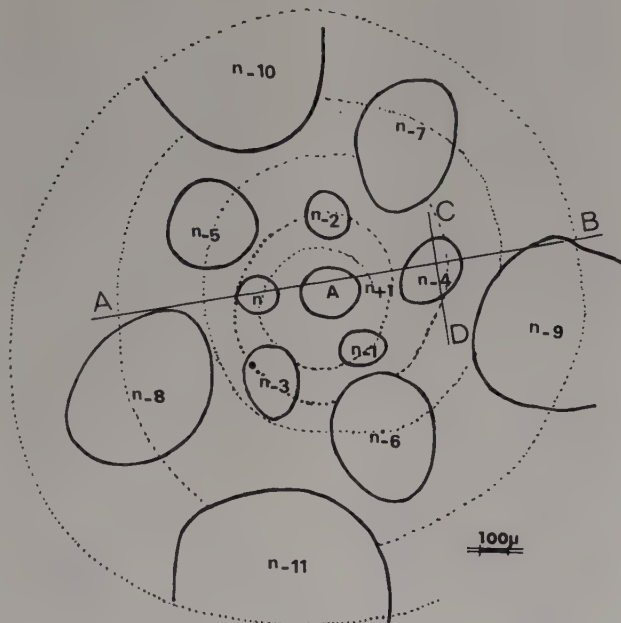
PLANCHE I

FIG. 6.

Schéma phyllotaxique présentant la disposition des primordiums et des ébauches foliaires (de $n+1$ à $n-11$) autour de l'apex A. Ces primordiums et ces ébauches s'inscrivent sur une spire se déroulant dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.

AB : plan selon lequel ont été effectuées les sections longitudinales axiales fournies par les planches II et III.

CD : plan selon lequel ont été effectuées les sections du primordium de rang $n-4$, illustrées par la planche IX, fig. c.



feuilles s'inscrivent sur une spire qui se déroule dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, tout au moins dans le cas des échantillons étudiés, selon une phyllotaxie au $2/5$ (fig. 6). Ceci signifie que l'on doit faire deux fois le tour de l'apex pour trouver deux feuilles à peu près situées sur la

PLANCHE I

FIG. a. — Aspect morphologique d'un rhizome du *Pteris cretica* L. f, feuilles; m, méristème; ra, racines. Les feuilles, nées sur la face ventrale du rhizome, se redressent (grande flèche); les racines, nées sur la face dorsale du rhizome, s'enfoncent dans le sol (petites flèches). (G. $\times \frac{1}{2}$.)

FIG. b. — Section transversale du rhizome du *Pteris cretica* L. effectuée au niveau de la cellule apicale. $n+1$, n , $n-1$ à $n-7$, sections des segments foliaires de plus en plus âgés entourant l'apex (A); pc, tissu procambial; ziv, zone d'initiation vasculaire. L'angle de divergence entre deux feuilles se succédant sur la spire phyllotaxique est de 144° environ. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times 65$.)

FIG. c et d. — Sections longitudinales axiales du méristème apical du *Pteris cretica* L. 1, 2, 3, 4, 5, les cinq zones du méristème définies par l'étude histologique. Les flèches soulignent l'extension de la zone 1.

c) Section effectuée dans le plan du primordium de rang $n-3$ (Pn-3) et de l'ébauche $n-7$; pc, procambium. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times 160$.)

d) Section effectuée dans le plan du dernier primordium formé Pn+1; ca, cellule apicale. Noter l'importance relative des vacuoles du cytoplasme et du noyau dans les diverses zones apicales. Navachine - hématoxyline. (G. $\times 370$.)

même génératrice, soit $n-1$ et $n-6$; durant ce trajet (fig. 6), on rencontre 5 feuilles au total.

En section longitudinale axiale, le méristème apical est constitué (Pl. I, fig. c) par un petit dôme très peu surélevé, entouré d'une zone plus aplatie dans laquelle se forment les primordiums foliaires (Pl. I, fig. c, $Pn-3$ et $n-7$, et Pl. I, fig. d, $Pn+1$). Ce dôme, de 120 à 130 μ de diamètre à sa base, montre en son centre une cellule apicale (Pl. I, fig. d, *ca*) de forme et de taille remarquables; de part et d'autre d'elle, on note une rangée superficielle de hautes cellules prismatiques qui subissent des cloisonnements anticlines et périclines (Pl. I, fig. d, *flèche courte*); cet ensemble est la zone 1 (Pl. I, fig. c et d, 1). Le dôme apical est limité en profondeur par une ou deux rangées de cellules allongées, étroites, construisant une sorte de « shell zone », ou zone en coquille appelée zone 4 (Pl. I, fig. c et d, 4). Entre la zone 4 et la cellule apicale, quelques cellules isodiamétriques forment la zone 3 (Pl. I, fig. c et d, 3), tandis que latéralement, entre la zone 1 et les ébauches foliaires déjà formées, on remarque une sorte de plateau sur lequel s'édifient les nouveaux primordiums, c'est la zone d'initiation foliaire ou zone 2 (Pl. I, fig. c et d, 2), assimilable par son rôle à l'anneau initial du méristème caulinaire des végétaux supérieurs.

Sous les zones 2 et 4, un tissu d'aspect parenchymateux se différencie. Il constitue une large base au méristème apical proprement dit, c'est la zone subapicale ou zone 5 (Pl. I, fig. c et d, 5). Ces cinq zones histologiques peuvent être distinguées aisément par l'examen de la taille et de la forme des cellules ainsi que par leurs positions respectives.

2° Etude histochimique.

a) **Les acides nucléiques.** — L'ADN. — La réaction de FEULGEN qui localise l'ADN permet de distinguer les zones dans lesquelles les noyaux sont les plus chromophiles tout en conservant parfaitement les dimensions nucléaires.

La planche II, figure a, présente une section longitudinale axiale du méristème apical effectuée dans le plan du dernier primordium formé (Pn).

Les noyaux des cellules des zones 1 et 3 sont peu colorés par le réactif de Schiff alors que les noyaux des cellules des zones 2, 4 et 5 sont très chromophiles.

Les différences dans l'affinité pour le réactif de Schiff s'accompagnent de variations importantes de la forme et des dimensions nucléaires au niveau des diverses zones. En effet, les noyaux des zones 2, 3 et 5 sont arrondis et peuvent être assimilés à une sphère. Le noyau de l'apicale et celui de ses dérivées sont allongés, il en est de même pour les noyaux de la zone 4. Afin que leur volume puisse être calculé, ces noyaux, examinés sur

la section où ils présentent leurs dimensions maximales, sont décomposés (fig. 7) en un cylindre médian dont la hauteur (H) et le diamètre (D_c) sont mesurés, et en deux demi-sphères a et b, dont le rayon (R) est déterminé. Le volume de ces noyaux est égal au volume du cylindre, augmenté du volume des deux demi-sphères. Le tableau I fournit les données numériques en μ et les volumes nucléaires moyens en μ^3 , estimés au niveau des diverses zones de cinq méristèmes traités par la technique de FEULGEN. On voit que ce sont les noyaux les plus volumineux des zones 1 et 3 qui sont les moins colorables.

L'ARN. — Les cellules de la zone 1 sont très vacuolisées et le cytoplasme forme de fines travées délimitant les vacuoles. Après coloration au vert

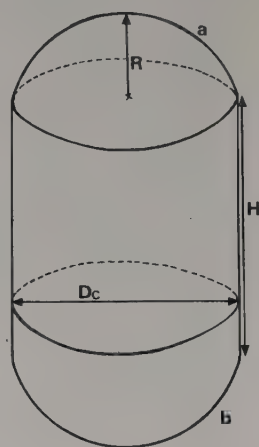


FIG. 7. — Schéma d'un noyau allongé des zones 1 et 4. Il peut être décomposé en un cylindre central, dont le diamètre (D_c) et la hauteur (H) peuvent être mesurés, et en deux demi-sphères (a et b), dont le rayon (R) peut être déterminé.

TABLEAU I. — DÉTERMINATION DES DIMENSIONS MOYENNES EN μ , ET DES VOLUMES NUCLÉAIRES EN μ^3 , DE CINQ MÉRISTÈMES ADULTES TRAITÉS PAR LA RÉACTION DE FEULGEN. Mesures portant sur tous les noyaux des diverses zones apicales examinés sur la section où ils présentent leurs dimensions maximales. D , diamètre nucléaire; H , hauteur; D_c , diamètre du cylindre central des noyaux allongés des zones 1 et 4 (voir fig. 7); R , rayon des demi-sphères a et b (voir fig. 7).

APEX N°	ZONE 1						ZONE 2	ZONE 3	ZONE 4			ZONE 5
	apicale			dérivées								
	Dc	H	R	Dc	H	R			D	D	Dc	
1.	8,6	9,8	4,2	9,2	8,5	3,4	12,1	13,6	5,1	4,2	1,4	10,3
2.	8,6	9,8	2,5	8,6	7	2,5	8,6	10,3	5,1	4,2	1,4	7
3.	7	7	3,6	7	7	2,5	9,2	12,1	5,1	5,6	1,5	10,3
4.	9,2	11,3	3,3	8,6	5,6	3,2	8,6	11,5	5,9	4,2	1,4	8,6
5.	12,1	14,1	3,3	8,6	9,8	3,2	12,1	13,6	5,1	4,2	2,2	10,3
Valeurs moyennes en μ .	9,1	10,4	3,4	8,4	7,5	2,9	10,1	12,2	5,3	4,5	1,6	9,3
Valeurs moyennes en μ^3 .	675,9 + 164,6 ~ 840			414,8 + 113,1 528			542	950	99,2 + 17,2 ~ 116			421

de méthyle-pyronine (Pl. II, fig. b), ces travées sont d'un rose très pâle alors qu'elles demeurent incolores sur les préparations préalablement traitées par la ribonucléase. Les cellules des zones 2, 3 et 4 sont moins vacuolisées que celles de la zone 1 et leur cytoplasme est aussi un peu plus pyroninophile (Pl. II, fig. b). Les cellules de la zone 5, en voie de différenciation, possèdent un cytoplasme essentiellement pariétal très faiblement coloré par la pyronine. Une légère zonation peut donc être mise en évidence, la zone 1 se révélant moins riche en ARN que la zone 2. Mais comparé à d'autres exemples, l'ensemble des cellules du méristème réagit faiblement au test de BRACHET. Les nucléoles sont tous très pyroninophiles et la ribonucléase ne les décolore jamais totalement.

Le tableau II présente les diamètres et les volumes nucléolaires moyens estimés au niveau des diverses zones de cinq méristèmes traités par le vert de méthyle-pyronine. Ces mesures, effectuées sur des échantillons fixés par un mélange coagulant, ne donnent que des indications relatives. Les variations des diamètres et des volumes nucléolaires, selon les zones apicales, sont parallèles aux variations des dimensions nucléaires. *Ce sont les noyaux les plus volumineux des zones 1 et 3 qui renferment les plus gros nucléoles.*

b) Les protéines. — Mise en évidence de la protéine totale. — Après la réaction de MAZIA, BREWERT et ALFERT, les fines travées cytoplasmiques de toutes les cellules du méristème prennent une coloration bleu très pâle et uniforme (Pl. II, fig. c). Les noyaux sont, par contre, très vivement colorés; cependant, ceux des cellules des zones 1 et 3 sont moins chromophiles que ceux des autres zones (Pl. II, fig. c). Une zonation n'est donc

PLANCHE II

FIG. a, b, c et d. — Etudes histochimiques effectuées sur des sections longitudinales axiales du méristème apical du *Pteris cretica* L. selon le plan AB (fig. 6). *ca*, cellule apicale; 1, 2, 3, 4, 5, les cinq zones histologiques du méristème.

a) Mise en évidence de l'ADN par la réaction de FEULGEN. Les noyaux des zones 1 et 3, les plus volumineux, sont beaucoup moins chromophiles que les noyaux plus petits des cellules des zones 2, 4 et 5. *Pn*, dernier primordium formé (G. $\times$ 370.)

b) Mise en évidence de l'ARN par le test de BRACHET. Le cytoplasme en fines travées est peu coloré. Les cellules de la zone 2 sont légèrement plus pyroninophiles que celles de la zone 1. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times$ 370.)

c) Mise en évidence de la protéine totale par le bleu de bromophénol. Le cytoplasme est très peu coloré; les noyaux des cellules des zones 2, 4 et 5 sont beaucoup plus chromophiles que ceux des cellules des zones 1 et 3. (G. $\times$ 370.)

d) Mise en évidence des protéines à groupements —SH par la méthode de BARNETT et SELIGMAN. La réaction ne fournit qu'une coloration rose, ce qui indique une faible teneur en groupements —SH. Le cytoplasme est faiblement coloré, les noyaux et les nucléoles sont tous très chromophiles. (G. $\times$ 370.)

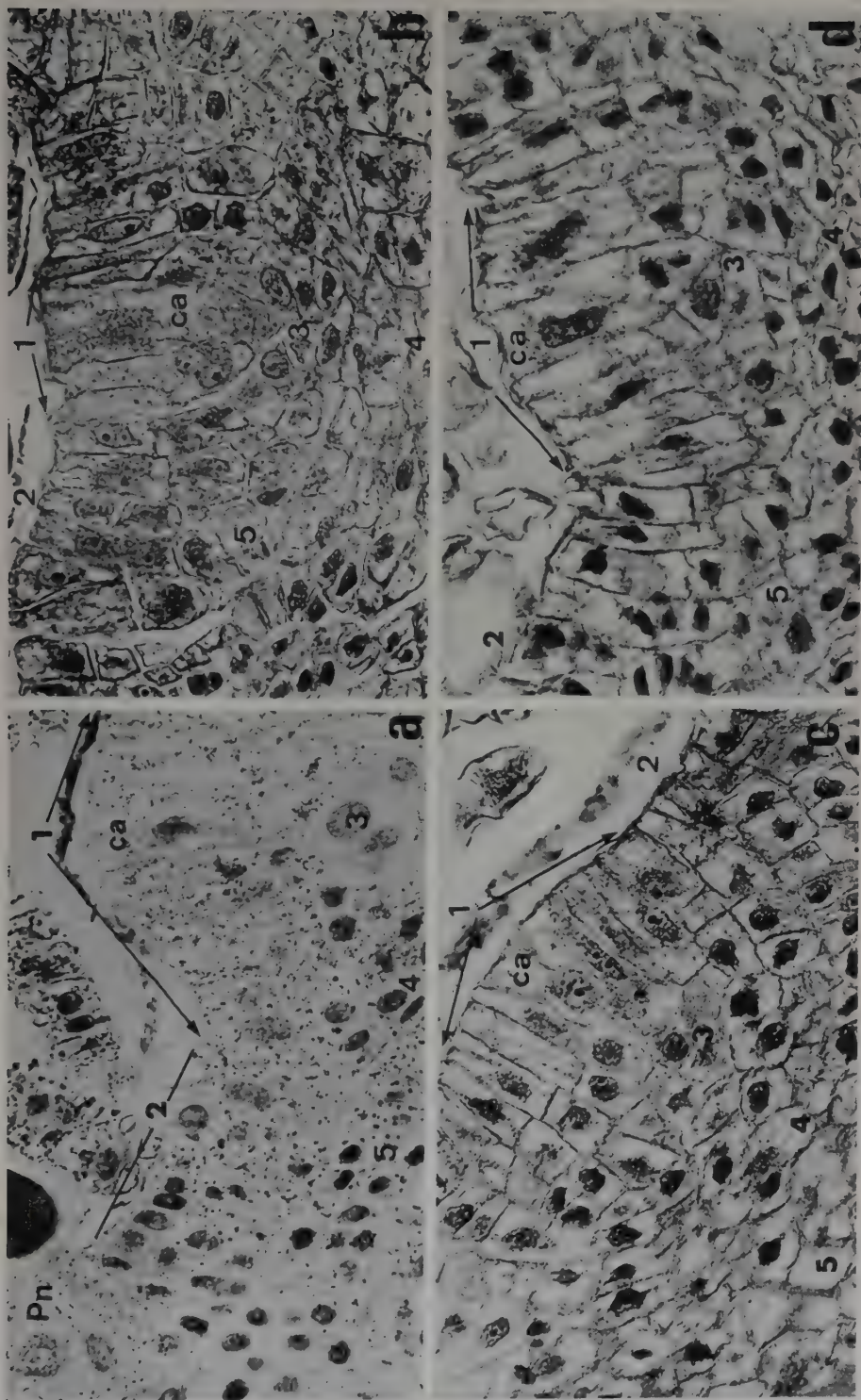


PLANCHE II

TABLEAU II. — DÉTERMINATION DES DIAMÈTRES NUCLÉOLAIRES MOYENS, EN μ , ET DES VOLUMES NUCLÉOLAIRES MOYENS, EN μ^3 , DANS LES DIVERSES ZONES APICALES DE CINQ MÉRISTÈMES ADULTES COLORÉS PAR LE VERT DE MÉTHYLE-PYRONINE. Les mensurations ont porté sur les nucléoles des noyaux de chacune des zones apicales.

APEX N°	ZONE 1		ZONE 2	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	apicale	dérivées				
	D	D				
1.	3,9	2,6	1,3	2,6	1,3	1,3
2.	4,2	3,2	2,6	3,2	1,3	1,3
3.	4,9	3,9	2,6	3,2	1,9	1,9
4.	3,9	2,6	1,9	2,6	1,3	1,3
5.	4,2	2,6	2,6	2,6	1,3	1,3
Diamètres moyens en μ .	4,2	2,98 ≈ 3	2,25	2,80	1,4	1,4
Rayons moyens en μ .	2,1	1,5	1,12	1,40	0,7	0,7
Volumes moyens en μ^3 .	38,78	14,13	5,88	11,49	1,44	1,44

repérable qu'au niveau nucléaire. Cette zonation est superposable à celle obtenue après la réaction de FEULGEN.

Détection des groupements —SH, liés aux protéines. — La plupart des thiols-protéines sont des enzymes et ce sont leurs groupements —SH qui assurent leur activité. Ces protéines ont donc une grande importance dans le métabolisme cellulaire. Leur intervention dans la mitose et dans la croissance a été souvent mise en évidence [20]. Leur détection histochemique a été faite par la méthode de BARNETT et SELIGMAN décrite page 32. La coloration obtenue, rouge orangé, qui ne vire jamais au bleu, prouve que les protéines à groupements —SH sont dispersées et peu abondantes dans les cellules du méristème. Dans les cellules des cinq zones apicales, les travées cytoplasmiques sont faiblement colorées, alors que les noyaux et les nucléoles sont tous très chromophiles (Pl. II, fig. d). Aucune zonation n'est reconnaissable.

Sur les préparations témoins traitées, après la réaction au DDD, par un bain de glutathion réduit, une coloration très légère et uniforme, beige rosé se développe aux niveaux cytoplasmique et nucléaire. Ceci montre bien que la coloration obtenue sur les sections *non traitées* par le glutathion réduit est due à la présence des groupements —SH.

c) *Les composés phénoliques.* — Selon LAURENT [38], le fixateur de REGAUD précipite toutes les substances polyphénoliques présentes dans

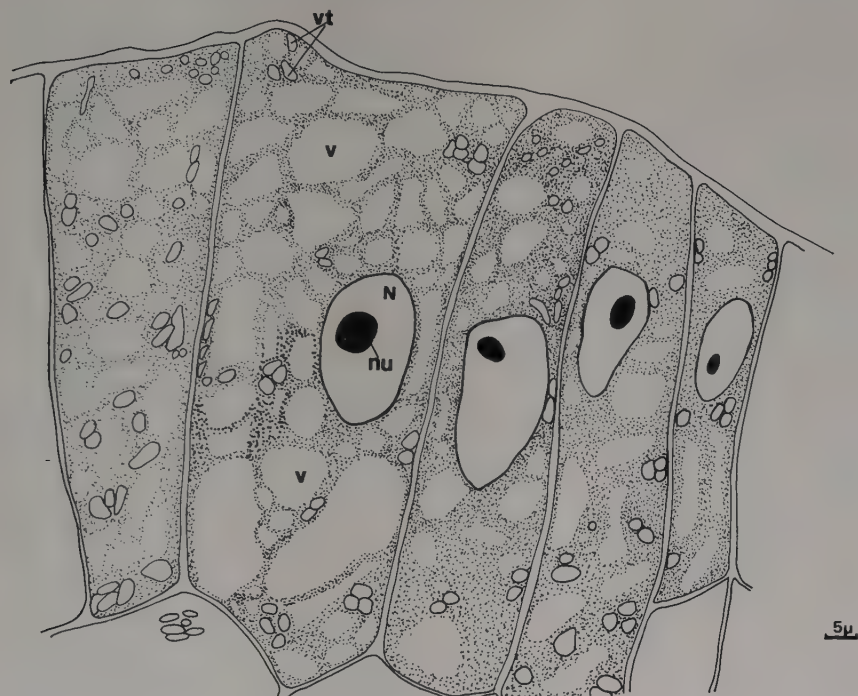


FIG. 8 a.

FIG. 8 a et b.

Répartition des vacuoles tannifères (vt) dans les cellules de la zone 1 (fig. 8 a) et de la zone 2 (fig. 8 b) après une fixation au mélange de REGAUD et une coloration à l'hématoxyline ferrique. N, noyau; nu, nucléole; v, vacuole.

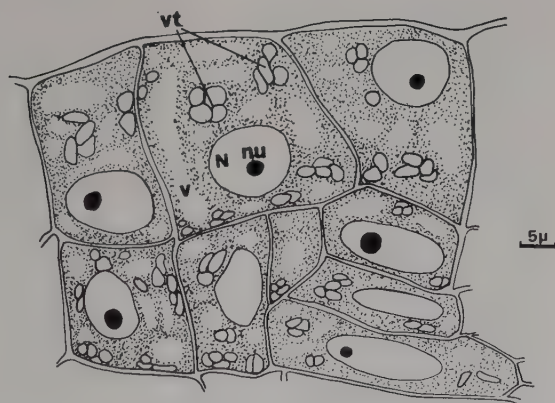


FIG. 8 b.

les cellules et met donc en évidence les tanins au sens large. Des substances tannifères se rencontrent fréquemment chez les Ptéridophytes, mais aussi chez les Végétaux supérieurs et leur abondance dans les tissus les moins différenciés a été remarquée par plusieurs chercheurs [43, 55, 84]. Le rôle joué par ces substances dans la plante n'est pas encore complètement élucidé et de nombreuses hypothèses ont été émises. Si certains auteurs,

en général anciens, affirment que les tanins sont des produits de déchets, les travaux récents, par contre, considèrent que ce sont des substances utiles à la plante à des titres divers. Pour VAN WISSELING [62] et pour REEVE [54], les tanins jouent un rôle dans l'édification des membranes, surtout au niveau de la lignification. Pour WHITE [84] et pour CAVALIE [8], les composés phénoliques participent, par une action tannante directe, à la protection de la plante contre une attaque microbienne. Pour d'autres, les tanins sont susceptibles de se transformer en substances métabolisables. MASON [40] les considère comme des substances de réserve équivalentes à de l'amidon et, selon LAURENT [38], chez les Filicinées, les cellules prothalliennes inanitiées sont capables d'utiliser les tanins aussi bien que l'amidon. De nombreux chercheurs ont mis en évidence le rôle des substances tannifères dans la respiration [43], dans l'activation ou l'inhibition de certaines enzymes [40]. Enfin, MOUREU et DUFRASSE [44] montrent que les tanins possèdent un important pouvoir anti-oxydant. Selon ces auteurs, leur présence dans les méristèmes freine la combustion trop active des métabolites que l'on trouve abondamment dans les tissus en voie de multiplication.

Après une fixation au mélange de REGAUD et une coloration à l'hématoxyline ferrique, les cellules du méristème apical du *Pteris* sont encombrées, quelle que soit la période de l'année, de très nombreuses petites vacuoles au contenu jaune brun : ce sont des vacuoles tannifères (Pl. III, fig. a, *vt*). Distinctes du système vacuolaire normal, ces vacuoles ont une taille à peu près équivalente dans les cellules des zones 1, 2 (voir fig. 8 a et b), mais aussi des zones 3 et 4; elles deviennent punctiformes dans les

PLANCHE III

FIG. a, b, c et d. — Etudes histochimiques effectuées sur des sections longitudinales axiales du méristème apical du *Pteris cretica* L. selon le plan AB (fig. 6). *ca*, cellule apicale; 1, 2, 3, 4, 5, les cinq zones du méristème.

a) Mise en évidence des vacuoles tannifères (*vt*) par une fixation au mélange de REGAUD et une coloration à l'hématoxyline ferrique. Dans les cellules des zones 1, 2, 3 et 4, la taille des vacuoles tannifères est à peu près comparable. Dans les cellules de la zone 5, ces vacuoles deviennent très fines. (G. $\times$ 280.)

b) Mise en évidence par la réaction P.A.S. des grains d'amidon présents dans un méristème en période de croissance active (avril à novembre). Noter la diminution du nombre des amyloplastes depuis la cellule apicale (*ca*) jusqu'aux cellules de la zone 2, et depuis la cellule apicale jusqu'aux cellules de la zone 5. *Pn*, dernier primordium formé. (G. $\times$ 380.)

c) Mise en évidence, par la réaction P.A.S., des grains d'amidon présents dans un méristème en période de croissance ralentie (décembre à mars). De nombreux amyloplastes sont visibles dans les cellules des cinq zones du méristème. Seules les cellules procambiales (*pc*) en sont dépourvues. *Pn*, dernier primordium formé. (G. $\times$ 160.)

d) Mise en évidence des lipides après fixation au mélange de MEVES et coloration au noir Soudan B. Seules les cellules de la zone 1 présentent des formations lipidiques. (G. $\times$ 380.)

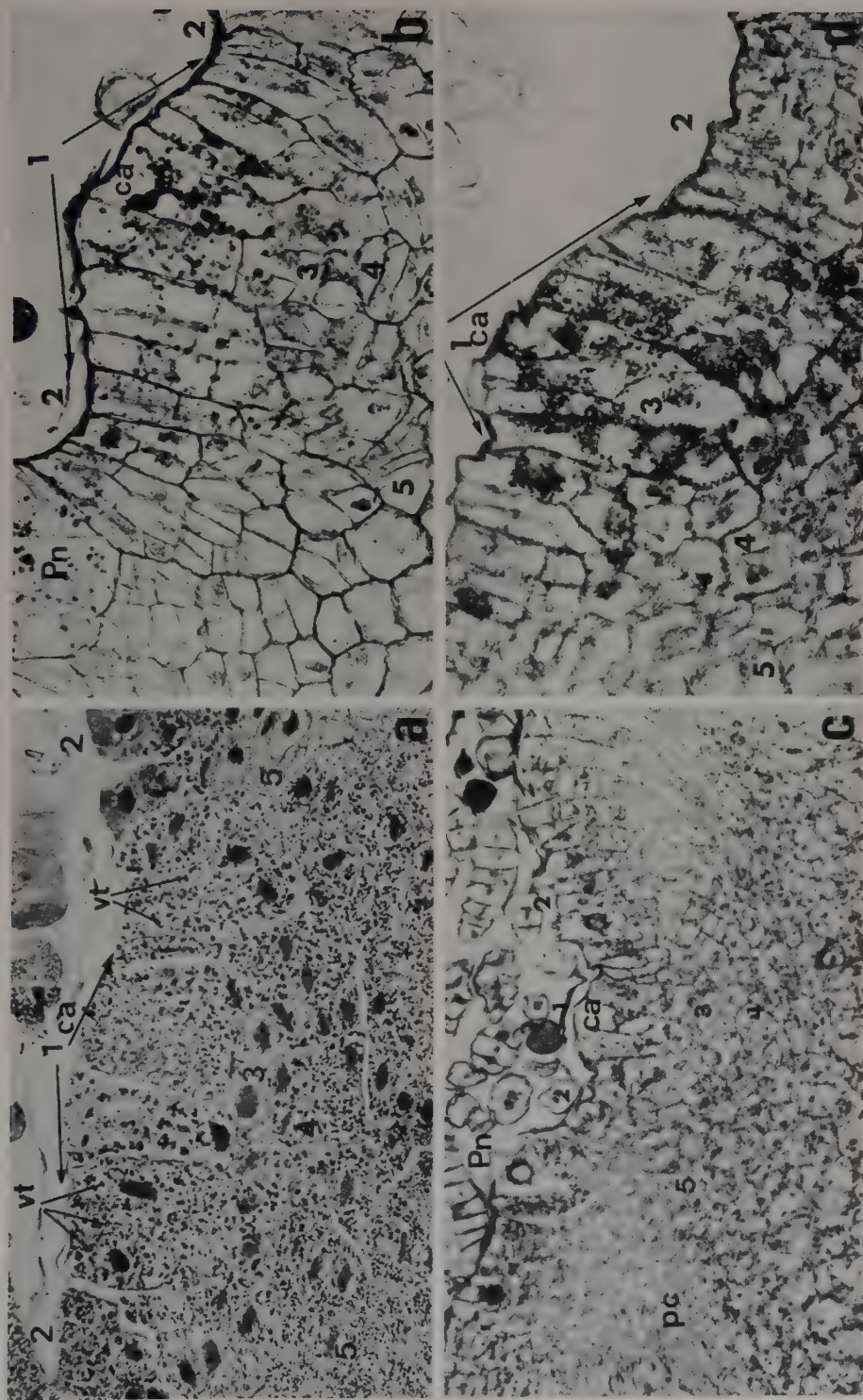


PLANCHE III

cellules de la zone 5 (Pl. III, fig. a). Mais étant donné la dimension des cellules de la zone 1, le nombre de ces vacuoles est évidemment plus élevé pour la cellule apicale et pour ses voisines que pour les cellules des autres zones. Cependant, proportionnellement à leur taille, les cellules de la zone 2 sont plus riches en vacuoles tannifères que celles de la zone 1 (comparer fig. 8 a et 8 b).

d) L'amidon et les lipides. — Des substances, moins souvent signalées dans les cellules méristématiques, ont été mises en évidence dans le méristème apical du *Pteris*. Ainsi, durant les mois de croissance active (d'avril à novembre), la réaction au P.A.S. révèle un grand nombre de plastas amyli-fères dans la cellule apicale et dans ses voisines, c'est-à-dire dans les cellules de la zone 1 (Pl. III, fig. b). Le nombre des plastas amyli-fères et la taille des grains d'amidon diminuent progressivement selon un gradient qui s'établit, d'une part, depuis la cellule apicale jusqu'aux cellules de la zone 2, et, d'autre part, depuis la cellule apicale jusqu'aux cellules des zones 3 et 4 (Pl. III, fig. b). Dans les cellules de la zone 5, les amyloplastes ne sont plus repérables par cette technique.

Durant les mois de croissance ralentie (de décembre à mars), les cellules des cinq zones apicales sont très riches en plastas amyli-fères (Pl. III, fig. c). Seules les cellules procambiales (*pc*) en sont dépourvues.

Sur des sections longitudinales axiales colorées par le noir Soudan B de méristèmes fixés au mélange de MEVES, des formations lipidiques ont été mises en évidence au cours de toutes les périodes de l'année, essentiellement dans les cellules de la zone 1 (Pl. III, fig. d).

WARDLAW estime que certains apex de l'*Asplenium nidus* [75] sont inertes parce que les cellules du méristème apical renferment des amyloplastes. Il est intéressant de noter que chez le *Pteris cretica*, les cellules de la zone 1 qui constituent le méristème apical proprement dit, d'après la terminologie de WARDLAW, sont toujours les plus riches en amidon et en lipides quelle que soit la période de l'année.

3° Etude cytologique en microscopie photonique et électronique.

En microscopie photonique, l'importance relative du cytoplasme, des vacuoles et du noyau dans les cellules des diverses zones du méristème est bien soulignée sur une section longitudinale axiale, après utilisation du fixateur de NAVACHINE, suivie d'une coloration à l'hématoxyline de REGAUD (voir Pl. I, fig. d). La cellule apicale pyramidale et ses voisines en forme de parallélépipède ont des dimensions particulièrement importantes, comparées aux cellules de la zone 2. Le tableau III présente les valeurs de la hauteur (*H*), de la longueur (*L*), estimées en section longitudinale, et de l'épaisseur (*E*), estimée en section transversale, des cellules des zones 1

et 2 évaluées sur les cellules de cinq apex différents. En assimilant l'apicale à une pyramide, ses voisines et les cellules de la zone 2 à un parallélépipède, les volumes en μ^3 ont pu être calculés.

TABLEAU III. — DÉTERMINATION DE LA HAUTEUR H, DE LA LARGEUR L ET DE L'ÉPAISSEUR E, MOYENNES, EN μ , DES CELLULES DES ZONES 1 ET 2. Mesures effectuées sur cinq méristèmes fixés au Navachine et colorés par l'hématoxyline de REGAUD. La hauteur et la largeur sont évaluées sur des sections longitudinales, l'épaisseur sur des sections transversales. L'apicale étant assimilée à une pyramide, les autres cellules à des parallélépipèdes, le volume moyen de ces cellules peut être calculé, en μ^3 .

APEX N°	ZONE 1						ZONE 2		
	apicale			dérivées					
	H	L	E	H	L	E	H	L	E
1.	108	42,4	37,1	54	11,2	13,6	25,2	13,6	16,8
2.	90	37,1	37,1	60	11,2	11,2	19,6	11,2	11,2
3.	108	42,4	42,4	60	13,6	11,2	23,8	11,2	11,2
4.	114	47,7	42,4	66	16,8	13,6	22,4	9,8	9,8
5.	96	37,1	31,8	54	9,8	9,8	16,8	11,2	11,2
Valeurs moyennes en μ .	103,2	41,3	38,1	58,8	12,5	11,9	21,5	11,4	12
Volumes moyens en μ^3 .	54 129,43 $\approx$ 54 130			8 731,8 $\approx$ 8 732			2 941,2 $\approx$ 2 941		

Les cellules de la zone 1 possèdent de nombreuses et très grandes vacuoles, leur cytoplasme à l'état de fines travées renferme un noyau allongé peu chromophile mais volumineux (voir tableau I). Cependant, à cause même de leurs grandes dimensions, le rapport nucléoplasmique (RNP), qui est une relation constante existant entre le volume du noyau et celui de la cellule, reste faible. Pour la cellule apicale, le RNP s'établit comme suit : $\frac{\text{volume nucléaire}}{\text{volume cellulaire} - \text{volume nucléaire}}$, c'est-à-dire $\frac{840}{53\,290}$, soit $\frac{1}{63}$.

Pour les cellules voisines de l'apicale, le RNP est de $\frac{528}{8\,204}$, soit $\approx$ de $\frac{1}{15}$.

Les cellules de la zone 2 qui sont beaucoup moins volumineuses possèdent quelques petites vacuoles. Leur noyau, de 10,1 μ de diamètre en moyenne, est très chromophile. Le RNP de ces cellules est de :

$\frac{542}{2\,399}$, soit $\frac{1}{4,5}$, valeur beaucoup plus élevée que pour la cellule apicale.

En microscopie électronique, la cellule apicale se caractérise essentiellement par l'importance de son système vacuolaire (Pl. IV, v). Le noyau (N), volumineux, allongé et de faible densité occupe en général le centre

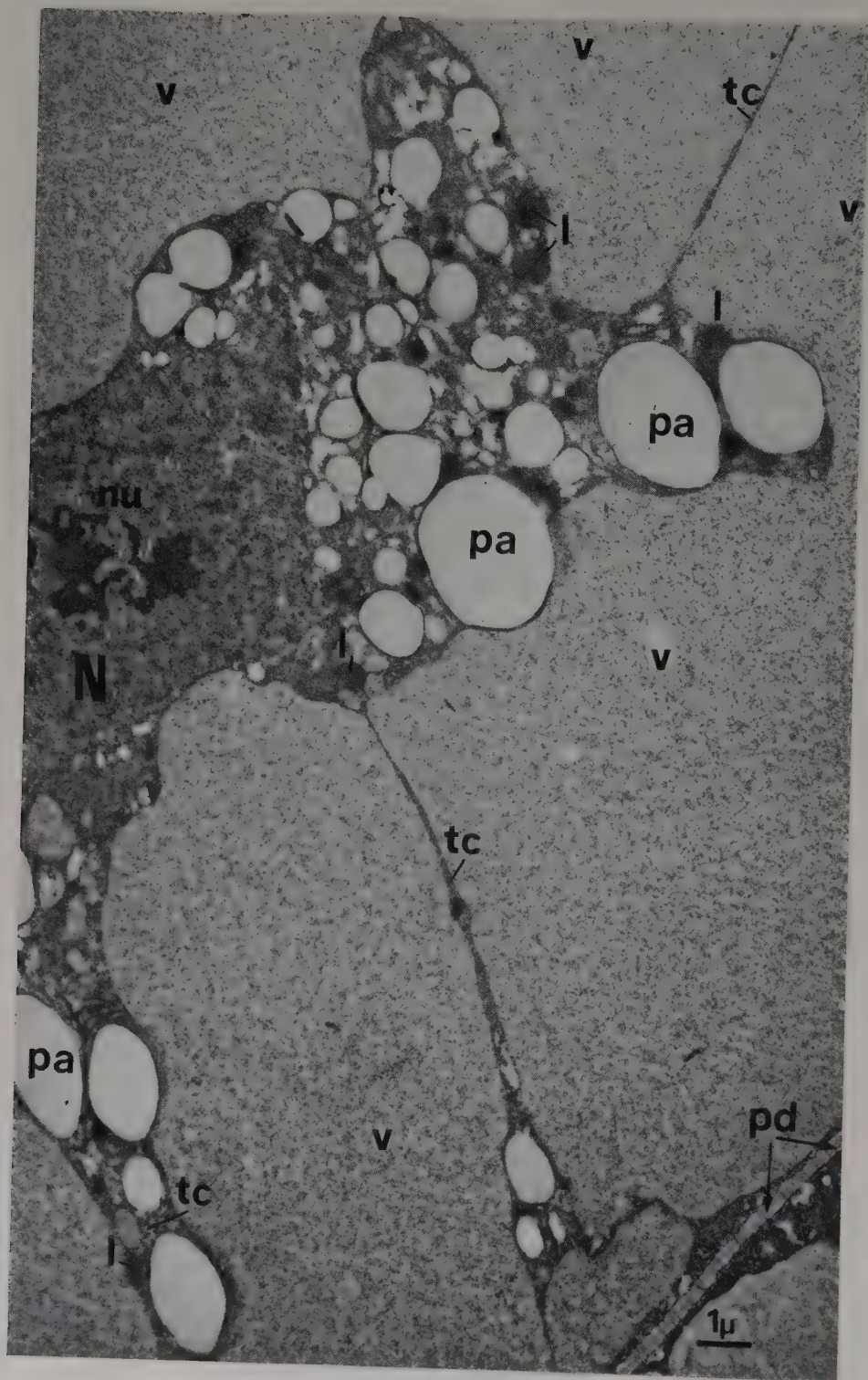


PLANCHE IV

de la cellule. Il renferme un nucléole (*nu*), d'aspect spongieux, dont le diamètre peut atteindre 4,9 μ . Le cytoplasme, peu abondant, se répartit essentiellement en deux films, l'un périnucléaire et l'autre pariétal, reliés entre eux par une multitude de très fines travées (Pl. IV, *tc*) que le microscope photonique révélait déjà (voir Pl. I, fig. d et Pl. II et III). Ce cytoplasme peu abondant est aussi de faible densité, mais les ribosomes y sont groupés en polysomes (Pl. V, fig. a, *flèches*). Les mitochondries (Pl. V, fig. a, *mi*) sont petites, très pauvres en crêtes et à stroma clair. Le réticulum endoplasmique, de type lisse, est peu développé (Pl. V, fig. b, *re*). Aucun dictyosome n'a été observé, ce qui semble indiquer que l'appareil de Golgi est peu représenté au niveau de l'apicale. De nombreuses gouttelettes lipidiques (Pl. IV et Pl. V, fig. a, *l*) sont visibles. Les plastes, nombreux et volumineux, sont souvent amyliifères (voir Pl. IV, *pa*), mais ils peuvent aussi renfermer des inclusions sombres (Pl. V, fig. a, *is*). Ces formations sont tout à fait comparables à celles décrites par SRIVASTAVA [59] dans les plastes des cellules cambiales du *Fraxinus americana*, et interprétées comme des lipoprotéines ayant un rôle dans la formation de nouvelles membranes plastidiales. La cellule apicale possède des membranes fines et communique avec les cellules voisines par un nombre de plasmodesmes extrêmement élevé (voir Pl. IV, *pd*).

Le développement très important de l'appareil vacuolaire de l'apicale et le nombre élevé de plastes amyliifères de fort diamètre, qui encombrant son cytoplasme, réduisent considérablement l'extension du cytoplasme libre et actif. L'emploi d'un planimètre a permis d'évaluer la quantité de cytoplasme libre sur une micrographie prise en microscopie électronique à un faible grandissement. La surface totale de la cellule apicale a été évaluée à 1 138 μ^2 . De la même façon, les surfaces du noyau, des plastes et des vacuoles ont été estimées respectivement à 64 μ^2 , 57 μ^2 et 841 μ^2 . L'ensemble de ces structures occupe donc dans l'apicale une surface de 962 μ^2 . La différence entre la surface totale de la cellule et celles du noyau, des plastes et des vacuoles fournit la surface du cytoplasme libre, soit : 1 138 — 962 = 178 μ^2 . Le cytoplasme libre ne représente donc, sur la section étudiée, que 15,6 % de la surface cellulaire.

Les cellules prismatiques superficielles entourant l'apicale possèdent les mêmes caractéristiques structurales que cette dernière.

La zone 1 montre donc un état cytotogique très particulier puisque les

PLANCHE IV

Aspect en microscopie électronique d'une partie de la cellule apicale. Dans cette cellule, les vacuoles (*v*) sont très importantes; le cytoplasme, réduit à de fines trabécules (*tc*), renferme des globules lipidiques (*l*) et des plastes amyliifères (*pa*). *N*, noyau allongé; *nu*, nucléole. Noter, dans les membranes fines, le nombre très élevé des plasmodesmes (*pd*) qui relie l'apicale à ses voisines. Fixateur : glutaraldéhyde postosmié. Contraste : KMnO_4 . (G. $\times$ 7 250.)

cellules qui la forment offrent à la fois des caractères de cellules méristématiques typiques : noyau et nucléole volumineux, mitochondries peu structurées, systèmes membranaires internes peu développés, membrane cellulaire fine et des caractères de cellules différenciées : vacuome important, plastas amylières et globules lipidiques nombreux, cytoplasme réduit et de faible densité.

Les cellules de la zone 2 (Pl. VI) ont un cytoplasme plus abondant que celles de la zone 1, bien que les vacuoles (*V*) soient toujours plus importantes que celles habituellement présentes dans des cellules méristématiques. Le hyaloplasme est aussi plus riche en ribosomes (Pl. VI, comparer avec Pl. V, fig. a), le réticulum endoplasmique (*re*) de type granulifère est assez peu développé et quelques dictyosomes (*d*) sont repérables. Les mitochondries (*mi*) assez nombreuses sont plus structurées que celles de la cellule apicale. Les gouttelettes lipidiques (*l*) sont par contre plus rares que dans les cellules de la zone 1. Il en est de même pour les plastas amylières (*pa*) dans lesquels on remarque parfois un cristal protéique ou de premières longues lamelles primordiales (*lp*). Dans ces plastas, des inclusions sombres (Pl. VI, *is*) sont aussi reconnaissables.

Bien que les cellules de la zone 2 ne possèdent pas toutes les caractéristiques ultrastructurales des cellules méristématiques typiques [4, 10, 24, 83], on peut cependant noter qu'elles sont plus méristématiques que celles de la zone 1. Entre ces deux zones, un gradient de dédifférenciation très progressif s'établit depuis l'apicale jusqu'à la zone d'initiation foliaire.

Les cellules de la zone 3 ont une ultrastructure très voisine de celle des cellules de la zone 2 [42].

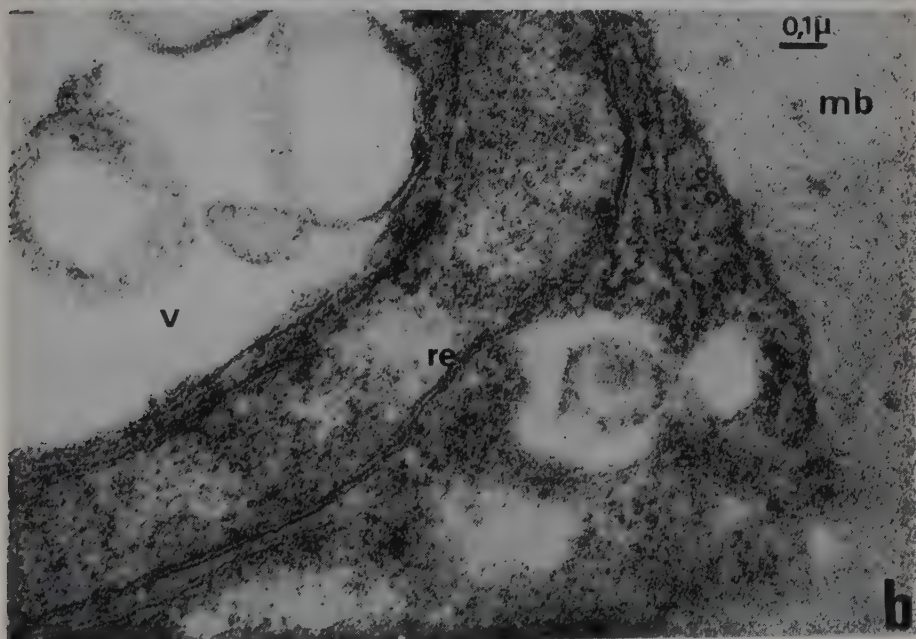
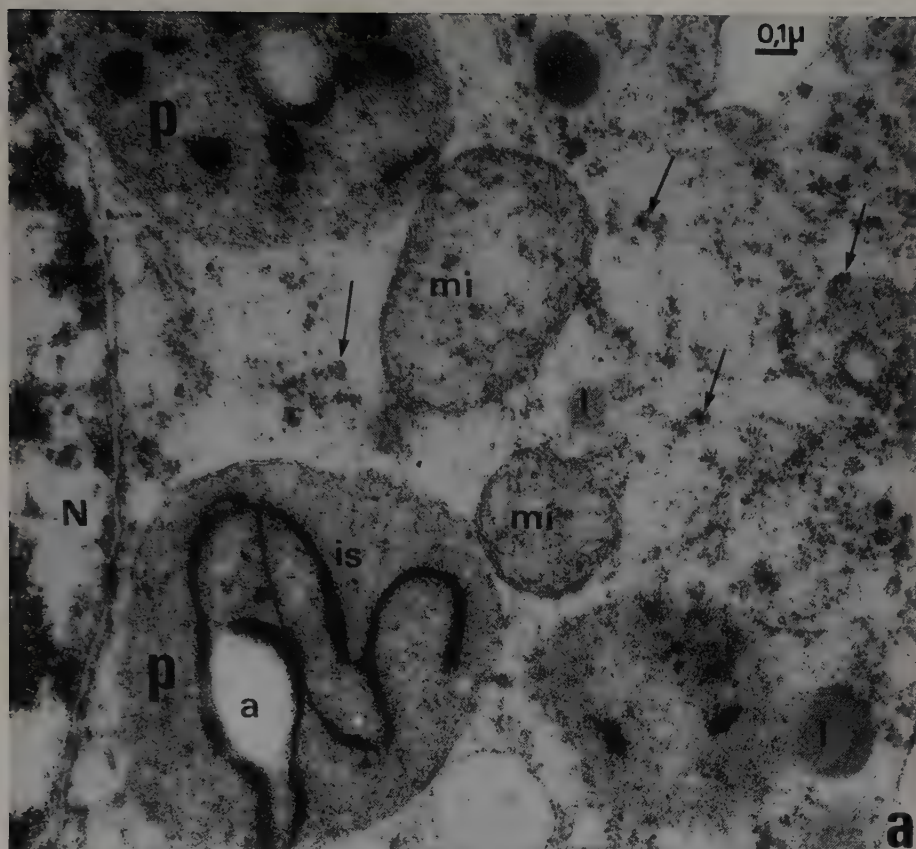
La planche VII présente un aspect en microscopie électronique des cellules étroites et allongées de la zone 4. Le cytoplasme abondant est riche en ribosomes et en polysomes (*flèches*), il renferme un réticulum endoplasmique, (*re*), important, de forme granulifère et des mitochondries (*mi*) allongées encore peu structurées. On peut déceler des gouttelettes lipidiques (*l*) et quelques plastas contenant parfois de l'amidon, parfois un cristal protéique (*cp*), parfois des inclusions sombres analogues à celles signalées dans les plastas des zones 1 et 2. Ces cellules offrent donc des caractères ultrastructuraux comparables à ceux des cellules procambiales

PLANCHE V

FIG. a et b. — Aspects de l'infrastructure de la cellule apicale. Fixateur : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : KMnO_4 .

a) Dans le cytoplasme de faible densité les ribosomes sont groupés en polysomes (*flèches*); des mitochondries (*mi*), petites, arrondies, peu riches en crêtes, de nombreux plastas (*P*) renfermant de l'amidon (*a*) et des inclusions sombres (*is*) sont reconnaissables. *l*, gouttelettes lipidiques; *N*, noyau. (G. $\times 52\,800$.)

b) Réticulum endoplasmique (*re*) peu développé et de type lisse. *mb*, membrane; *v*, vacuole. (G. $\times 59\,400$.)



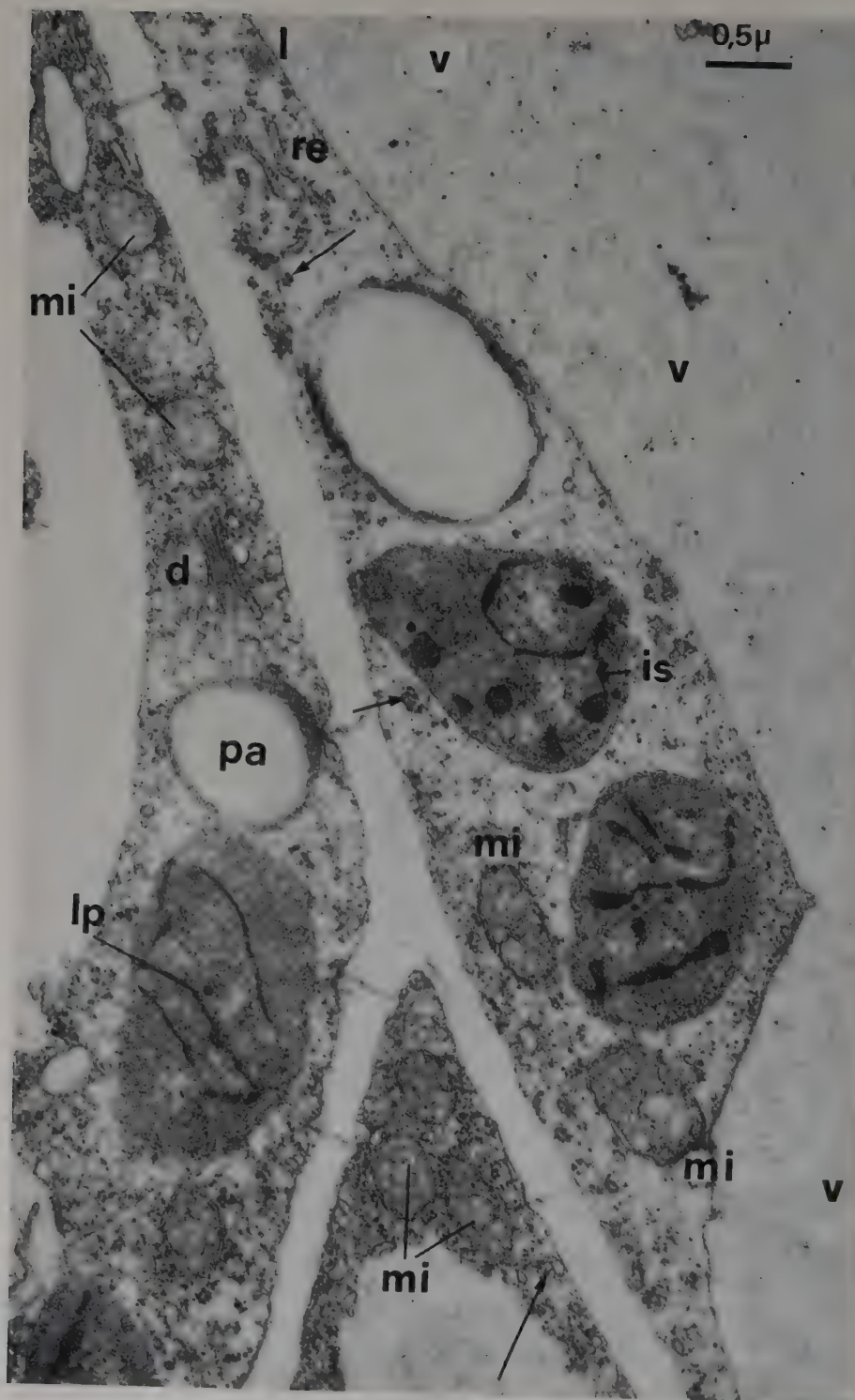


PLANCHE VI

typiques et, bien que leurs vacuoles soient moins développées, elles sont aussi très voisines par leur infrastructure des cellules histogènes de type cambial [4, 24].

4^o Conclusions.

Ces résultats, tant histologiques, histochimiques que cytologiques, montrent que les cellules du méristème apical du *Pteris* ne présentent pas les caractères classiquement admis de cellules méristématiques typiques. En effet, ces cellules ont un rapport nucléoplasmique faible, elles sont vacuolisées; leur cytoplasme peu important est relativement pauvre en ARN, en protéine totale, en protéines à groupements —SH, alors qu'il est, au contraire, riche en amidon et en lipides.

La cellule apicale est la cellule la plus différenciée de tout l'apex. C'est elle qui a le rapport nucléoplasmique le plus faible (1/55), le cytoplasme le plus vacuolisé et le moins dense, le noyau le moins chromatique et qui possède le plus d'amidon et de lipides. Entre la cellule apicale et les cellules de la zone 2, un gradient de dédifférenciation s'établit : les cellules dont le rapport nucléoplasmique augmente ont un cytoplasme moins vacuolisé et plus riche en ARN; leur noyau devient plus chromatique, elles s'appauvrissent en amidon et en lipides, mais elles s'enrichissent en composés phénoliques. Elles acquièrent ainsi des caractères de cellules méristématiques primaires organogènes.

Un même gradient de dédifférenciation existe entre la cellule apicale et les cellules de la zone 4 qui ressemblent par leur infrastructure à des cellules cambiales. Le long de ce gradient, les cellules deviennent donc par leurs caractères, comparables à des cellules histogènes. Les cellules constituant la zone 5 sont déjà différenciées en cellules de parenchyme, mais leur noyau, souvent rejeté contre la paroi cellulaire, est encore très chromatique.

Dans le méristème du *Pteris*, le volume nucléolaire le plus important est celui de la cellule apicale (voir tableau II). Ce volume diminue tout au long du gradient de dédifférenciation et les cellules de la zone 2 possèdent des nucléoles plus petits que ceux de la zone 1 (voir tableau II). Ce fait a

PLANCHE VI

Ultrastructure des cellules de la zone 2 du méristème apical du *Pteris cretica* L. Les vacuoles (*v*) sont bien développées. Noter les ribosomes parfois associés en polysomes (*flèches*), les nombreuses mitochondries (*mi*), les dictyosomes (*d*) et le réticulum endoplasmique de type granulifère (*re*). Les granules lipidiques (*l*) sont rares; dans les plastes amyli-fères (*pa*), moins nombreux que dans les cellules de la zone 1, on remarque les premières lamelles primordiales (*lp*) en cours de différenciation et des inclusions sombres (*is*). Fixateur : glutaraldéhyde postosmié. Contraste : KMnO₄. (G. × 33 250.)

été remarqué également par BONNOT [3] dans le méristème de quelques Bryophytes. D'une façon générale pourtant, chez les Angiospermes, ce sont les cellules les plus méristématiques qui renferment les nucléoles les plus volumineux [6]. Ce comportement inhabituel des nucléoles est peut-être dû aux différences de dimensions qui existent entre la cellule apicale et les autres cellules, mais il faut remarquer cependant que les nucléoles de la zone 1 sont toujours très pyroninophiles.

C. — *Fonctionnement du méristème.*

1° *Formation et évolution d'un primordium.*

Le schéma phyllotaxique présenté par la figure 6 permet de prévoir le lieu de formation de la nouvelle feuille de rang $n+1$. $n+1$ est initiée en avant de l'ébauche de rang $n-4$.

La figure 9 présente une section longitudinale axiale passant par le plan AB (voir fig. 6, AB). Entre la base du dôme apical et l'ébauche foliaire de rang $n-4$ ($Fn-4$), la zone 2 mesure 300 μ . Dans la zone 2, à 80 μ environ de la cellule apicale (ca), une cellule superficielle double de volume (fig. 9, cs). Simultanément ses caractères méristématiques s'accroissent (Pl. VIII, fig. a, cs) et son rapport nucléoplasmique passe de $1/4,5$ à $1/2$. Le diamètre originel de son noyau de 10,1 μ environ passe à 16 μ et le diamètre nucléolaire s'accroît de 2,25 μ à 5 μ . La chromophilie nucléaire décroît cependant aussitôt, comme en témoigne la réaction de FEULGEN, tandis que le nucléole devient fortement pyroninophile (Pl. VIII, fig. a, cs). Le cytoplasme de cette cellule particulière se colore aussi plus intensément par la pyronine mais il présente toujours de nombreuses vacuoles (v). La cellule (cs) subit alors une division oblique (Pl. VIII, fig. b, *flèche en tirets*) qui isole une cellule apicale (caf) de sa première dérivée (da). Dès ce moment, un nouveau processus de différenciation cellulaire débute. La réaction au P.A.S. (Pl. VIII, fig. c) révèle, en effet, une quantité beaucoup plus importante de grains d'amidon dans l'apicale (caf) qui vient d'être isolée et dans sa première dérivée (da), que dans les cellules voisines. L'isolement de cette

PLANCHE VII

Aspect en microscopie électronique des cellules de la zone 4 du méristème apical du *Pteris cretica* L. Les vacuoles (v), sont peu volumineuses. Dans le cytoplasme, de nombreux ribosomes sont souvent groupés en polysomes (*flèche*); le réticulum endoplasmique granulifère (re) est bien développé; les mitochondries (mi) sont allongées et peu structurées. Dans les plastes, on remarque parfois un cristal protéique (cp). l , gouttelette lipidique. Fixateur : glutaraldéhyde postosmié. Contraste : $KMnO_4$. (G. $\times 17\ 500$.)

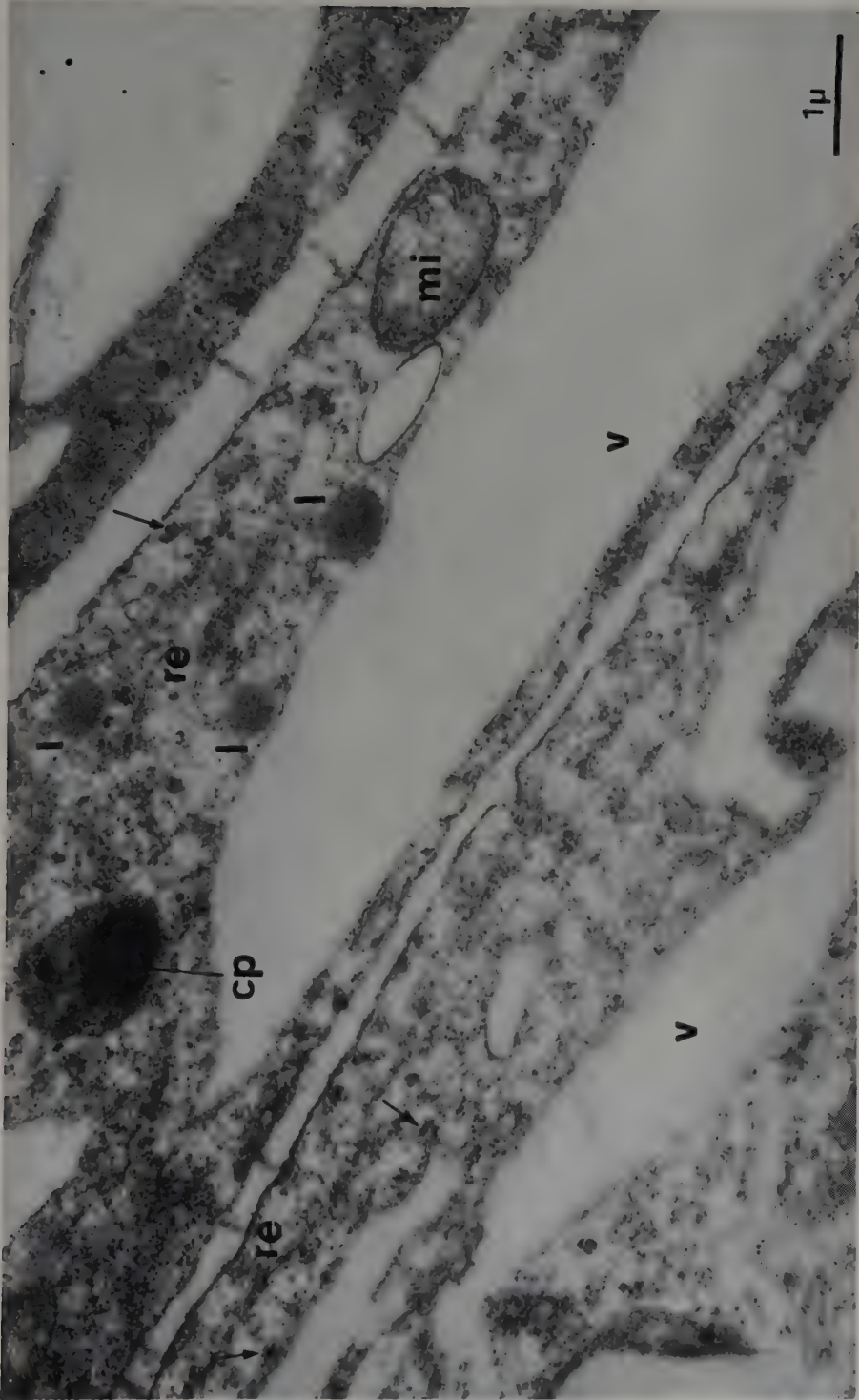


PLANCHE VII



PLANCHE VIII

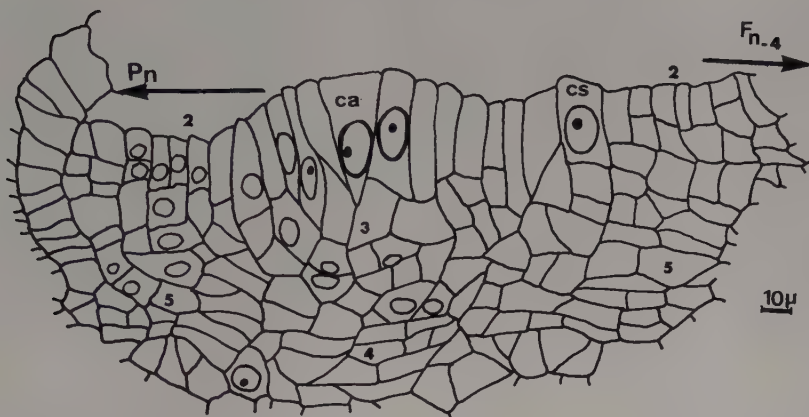


FIG. 9. — Schéma d'une section longitudinale axiale du méristème apical effectuée selon le plan AB de la figure 6. Dans la zone 2, à la base de la feuille de rang $n-4$ (F_{n-4}), une cellule superficielle (cs) s'accroît. C'est la future apicale de la feuille de rang $n+1$. ca , cellule apicale de l'axe; P_n , primordium de rang n ; 1, 2, 3, 4, 5, les cinq zones du méristème apical.

cellule apicale provoque une activation des cellules sous-jacentes qui se recloisonnent rapidement (voir Pl. VIII, fig. b, *flèche épaisse*). La cellule apicale (caf) fonctionne aussi et construit des dérivées nouvelles (da) aisément identifiables au cours des premiers stades (Pl. VIII, fig. d).

PLANCHE VIII

FIG. a, b, c et d. — Sections longitudinales illustrant la mise en place du primordium foliaire $n+1$ ainsi que celle de son système vasculaire.

a) Près du dôme apical, une cellule superficielle (cs) de la zone 2 s'accroît en augmentant simultanément son rapport nucléoplasmique. Les cellules procambiales (pc) visibles sous la zone 2 appartiennent, en fait, au segment foliaire déjà formé de la feuille de rang $n+1$. ca , cellule apicale de l'axe; v , vacuoles; 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones apicales. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times 380$.)

b) La cellule superficielle (cs), de la figure a, subit une division oblique (---) qui isole l'apicale foliaire (caf), de sa première dérivée (da). Simultanément, les cellules situées sous l'apicale se recloisonnent ($\rightarrow$). 2 et 5, zones apicales; pc , cellules procambiales appartenant au segment foliaire de la feuille de rang $n+1$. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times 380$.)

c) Dès sa formation, l'apicale foliaire (caf) ainsi que sa première dérivée (da) renferment un plus grand nombre de grains d'amidon que les cellules voisines. Ethanol - formol - acide acétique - P.A.S. (G. $\times 660$.)

d) L'apicale foliaire (caf), produit des dérivées (da), alors que les cellules sous-jacentes qui se sont recloisonnées forment le faisceau procambial de $n+1$. Le tiret indique la jonction entre le faisceau procambial appartenant au segment foliaire et celui appartenant à la fronde de la feuille de rang $n+1$. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times 380$.)

Par ces processus, un organe nouveau vient de naître : le *primordium foliaire*. Son individualisation s'effectue à partir d'une cellule de la zone 2 qui subit, *avant de se diviser*, une évolution cytologique caractéristique, avec augmentation de taille et du rapport nucléoplasmique. La division ultérieure, *inégale*, crée vraiment l'apicale foliaire et sa première dérivée.

Le primordium jeune est un organe composite, à l'édification duquel participent, à la fois, les dérivées de l'apicale et des cellules de la zone 2, issues des recloisonnements des cellules sous-jacentes à cette apicale. A ce stade, la cellule apicale du primordium a, en moyenne, une largeur de $64,6\ \mu$, une épaisseur de $40,3\ \mu$ et une hauteur de $46,2\ \mu$; elle possède trois ou quatre grandes vacuoles en section, et son cytoplasme est peu colorable par

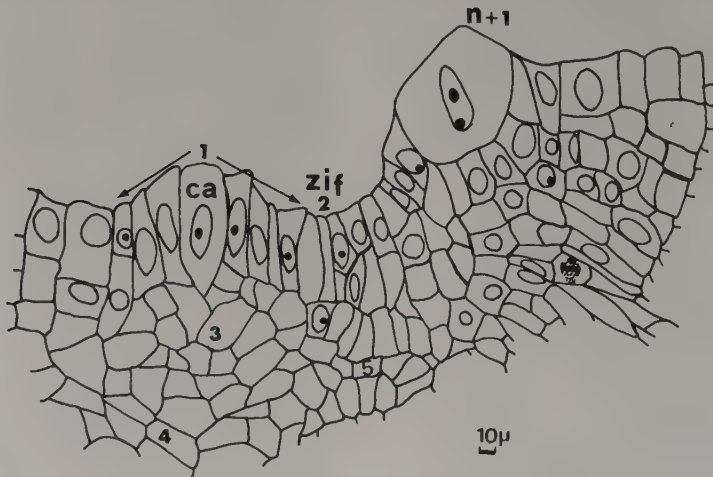


FIG. 10. — Schéma d'une section longitudinale axiale du méristème apical du *Pteris cretica* L. Le primordium de rang $n+1$ vient de surgir, la zone 2 ou zone d'initiation foliaire (*zif*) est considérablement réduite. *ca*, cellule apicale de la tige; 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones apicales.

la pyronine, son noyau volumineux qui mesure $16\ \mu$ de diamètre environ (Pl. VIII, fig. d) est pourvu d'un gros nucléole (non visible sur la photographie présentée). Dès sa mise en place, elle renferme de l'amidon (voir Pl. VIII, fig. c). Elle se distingue de la cellule apicale de l'axe par sa forme beaucoup plus évasée, par l'absence de globules lipidiques et par son aspect plus méristématique : son rapport nucléoplasmique, évalué à $1/15$, est en effet plus élevé que celui de l'apicale de l'axe et sa pyroninophilie est un peu plus marquée.

Le primordium $Pn+1$ s'accroît essentiellement par l'activité mitotique de la cellule apicale qui, sur ses trois faces, isole des dérivées subissant de nombreux cloisonnements anticlines (Pl. VIII, fig. d, *flèche*) et périclines (Pl. IX, fig. b, *flèche*). Les cellules situées sous l'apicale et qui proviennent des

cloisonnements péricleines de ses dérivées forment le faisceau procambial (Pl. VIII, fig. d, et Pl. IX, fig. a, *pc*). Au cours de sa croissance, le primordium (Pl. IX, fig. a et b) s'incurve vers la zone apicale de l'axe. Un parenchyme dorsal (Pl. IX, fig. b, *pd*), puis un autre ventral (*pv*) se différencient : le primordium est devenu une ébauche foliaire.

La surrection du primordium foliaire $n+1$ réduit la zone 2 ou « zone d'initiation foliaire » à $80\ \mu$ de largeur (fig. 10, *zif*). Tandis que les feuilles de rang $n+2$ et $n+3$ sont formées dans d'autres secteurs du méristème, la zone 2 se régénère et s'épaissit en avant de $n+1$ par le jeu de cloisonne-



FIG. 11. — Schéma d'une section longitudinale axiale du méristème apical du *Pteris cretica* L. Régénération de la zone 2 ou zone d'initiation foliaire (*zif*) par des cloisonnements anticlines et péricleines (*petites flèches*). *ca*, cellule apicale de l'axe; $n+1$, primordium de rang $n+1$; 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones apicales.

ments anticlines et péricleines (fig. 11, *flèches*). Ces processus repoussent progressivement l'ébauche foliaire $n+1$ à la périphérie de l'aire apicale. La zone 2, reconstruite, mesure à nouveau $300\ \mu$ environ en avant de $n+1$. Le territoire ainsi préparé sera utilisé pour l'initiation de la feuille de rang $n+6$ comme permet de le prévoir la poursuite du tracé phyllotaxique présenté par la figure 6.

La zone 2 subit donc des variations de diamètre considérables en fonction du rythme plastochronique. Le dôme apical, au contraire, formé par les zones 1 et 3, conserve un diamètre basal constant quelle que soit la phase du plastochrone.

2° Le tissu procambial.

Les modalités selon lesquelles le faisceau procambial s'installe dans le jeune primordium sont illustrées par les planches VIII et IX. Sous la cellule qui va former l'apicale du primordium de rang $n+1$ (Pl. VIII, fig. a, *cs*) et à sa droite, dans la partie supérieure de la zone 5, on reconnaît des cellules procambiales (Pl. VIII, fig. a, *pc*). L'examen de sections sériées prouve que ces cellules appartiennent à un système provasculaire en liaison directe avec le faisceau procambial de l'ébauche foliaire plus âgée, située dans le même plan, c'est-à-dire celui de l'ébauche de rang $n-4$. Le territoire situé en avant de l'ébauche foliaire $n-4$ et compris entre son aisselle et l'initiale de la future feuille $n+1$ a valeur de *segment foliaire* : c'est le segment de la future feuille $n+1$. Il s'ensuit que ce segment est mis en place précocement à partir des cellules de la zone 2, bien avant que l'apicale foliaire de $n+1$ ne s'individualise. De plus, la différenciation du système vasculaire de ce segment qui est en liaison directe, comme nous venons de le voir, avec le faisceau procambial de l'ébauche $n-4$ précède de beaucoup celle des premières cellules provasculaires de la feuille $n+1$. La planche VIII, fig. b, montre que les cellules procambiales (*pc*) du segment foliaire $n+1$ sont en contiguïté avec les petites cellules recloisonnées (*flèche*) situées sous l'apicale foliaire (*caf*) qui vient de se former. On remarque bientôt (Pl. VIII, fig. d), sous l'apicale et ses dérivées, l'individualisation des premières cellules procambiales (*pc*) appartenant, *en propre*, au jeune primordium $n+1$ (voir limite matérialisée par une ligne en tirets). A mesure que l'ébauche foliaire $n+1$ s'accroît, un cordon procambial plus épais s'élabore (Pl. IX, fig. a et b, *pc*) à partir de cellules issues des cloisonnements péri-

PLANCHE IX

FIG. a et b. — Evolution du primordium foliaire $n+1$ (fig. a) en une jeune ébauche foliaire (fig. b). Au cours de la croissance du primordium, l'apicale foliaire (fig. a, *caf*) forme des dérivées (*da*) qui se recloisonnent (*flèche*) et dont certaines s'organisent en un faisceau procambial (*pc*). La transformation du primordium en ébauche est marquée (fig. b) par la différenciation, de part et d'autre du faisceau procambial (*pc*), d'un parenchyme dorsal (*pd*) puis d'un parenchyme ventral (*pv*). Noter le recourbement de la jeune ébauche vers l'axe. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times 380$.)

FIG. c. — Section d'un primordium foliaire effectuée dans un plan perpendiculaire à ceux des figures a et b, selon le plan CD (voir fig. 6) et montrant la présence de deux faisceaux procambiaux (*pc1* et *pc2*) se rejoignant en un faisceau unique (*pc*) après leur entrée dans la tige. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times 280$.)

FIG. d. — Section transversale effectuée dans le rhizome selon le plan ED (voir fig. 14). Le plan des anneaux vasculaires des segments foliaires $n+1$ à $n-4$ est oblique par rapport à l'axe du rhizome. Ces anneaux vasculaires sont en contiguïté (*flèches*). R, tissu vasculaire se dirigeant vers les racines. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times 65$.)

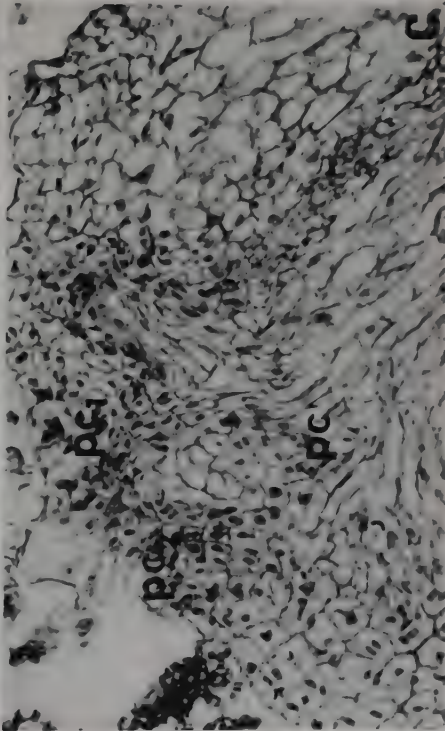
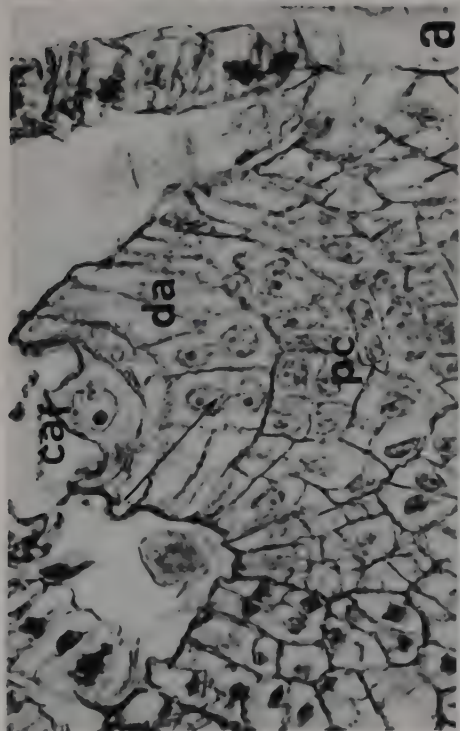
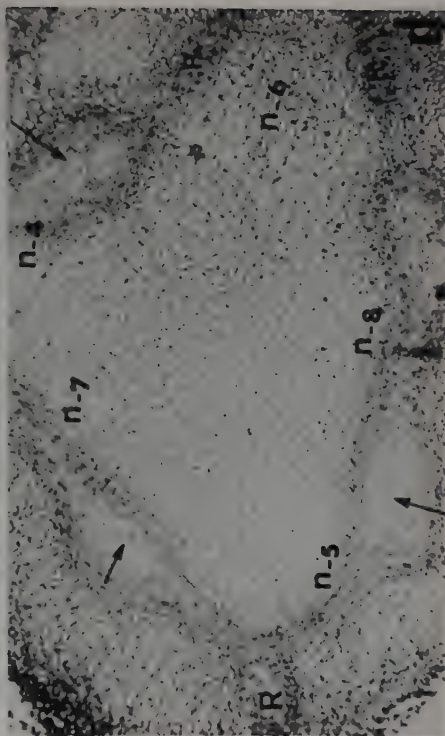


PLANCHE IX

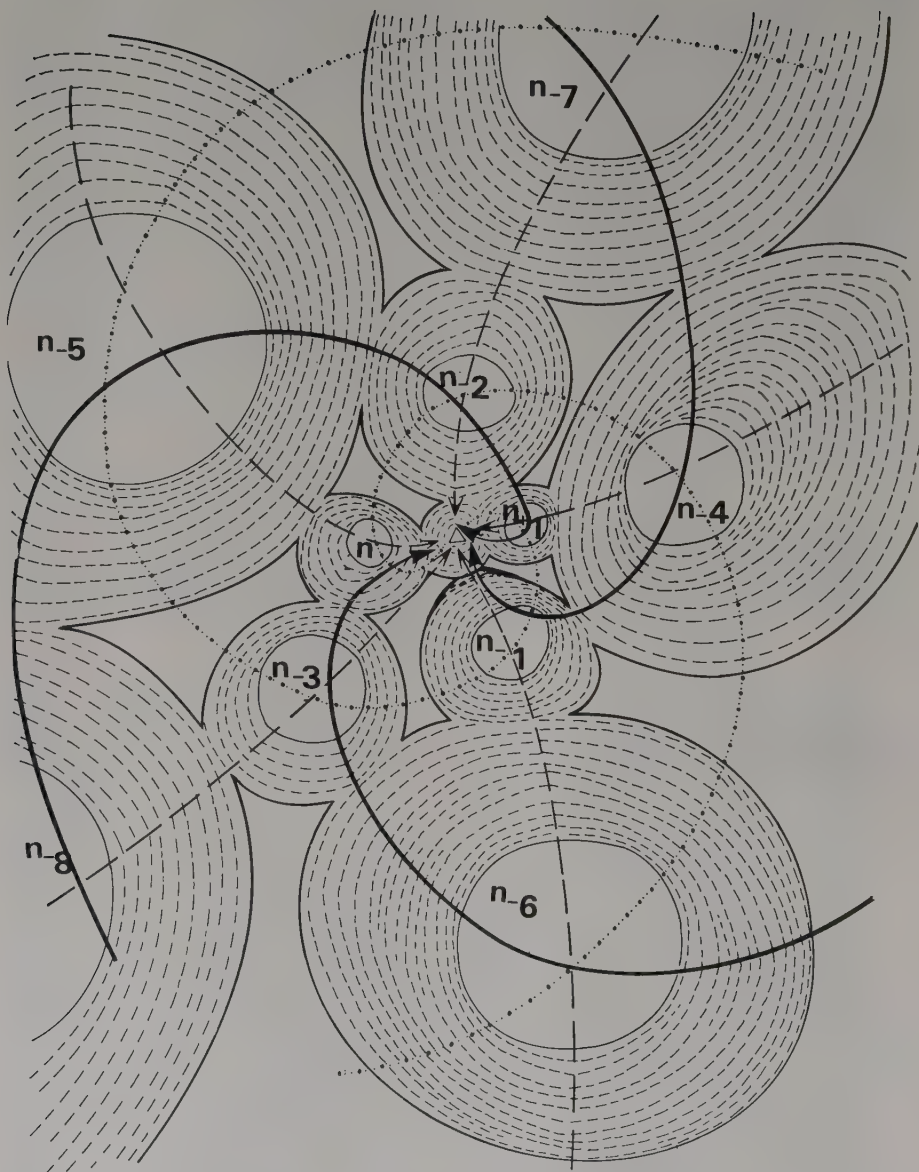


FIG. 12. — Schéma phyllotaxique établi par la superposition de trois sections transversales du méristème apical du *Pteris cretica* L. La disposition des feuilles autour du méristème peut s'inscrire en plus de la spire phyllotaxique (fig. 6) sur un système de cinq orthostiques (---), de trois (→) ou de deux parastiques (•...•). Seules les feuilles, dans les stades jeunes, situées sur cinq orthostiques ou trois parastiques présentent une contiguïté au niveau des cordons vasculaires entourant la base foliaire.

clines des dérivées de l'apicale. Mais à sa base, ce cordon reste toujours en contiguïté avec le système provasculaire de son segment relié à celui de la feuille de rang $n-4$: ainsi, le système vasculaire s'installe de proche en proche à partir des cordons plus âgés. *Les feuilles qui sont formées dans un même plan longitudinal et qui sont disposées sur une même orthostique ont donc des systèmes vasculaires en contiguïté.* Ce sont en particulier $n+1$,

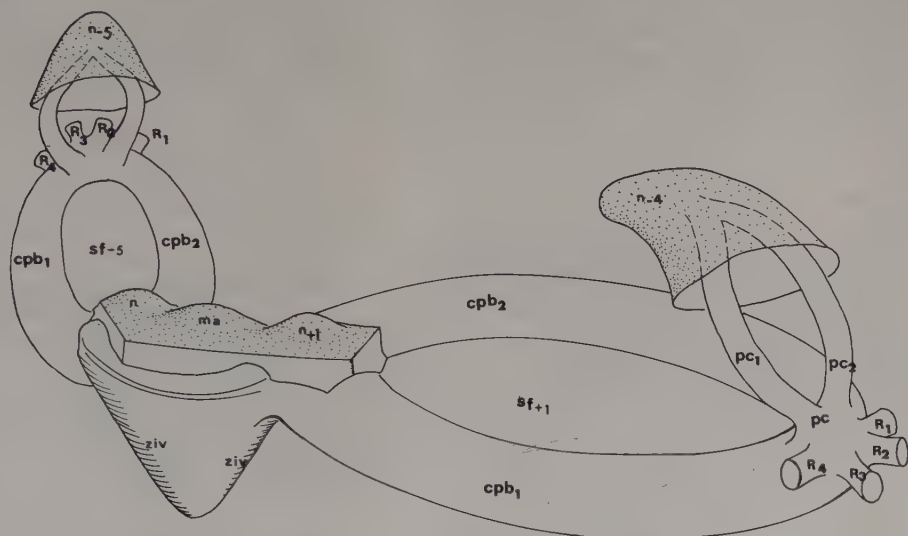


FIG. 13. — Diagramme représentant schématiquement la disposition des faisceaux procambiaux dans le méristème apical du *Pteris cretica* L. Les cordons procambiaux ($pc1$ et $pc2$) de l'ébauche foliaire de rang $n-4$ fournissent un cordon unique (pc) à leur entrée dans la tige. A ce niveau, 4 cordons se dirigent vers les racines ($R1$, $R2$, $R3$, $R4$) et 2 ($cpb1$ et $cpb2$) parcourant le segment foliaire $sf+1$, se dirigent vers le méristème apical (ma). Tous les cordons entourant les bases foliaires des jeunes ébauches foliaires situées autour du méristème se réunissent au niveau apical dans la zone d'initiation vasculaire (ziv). Cette zone d'initiation vasculaire a la forme d'une cuvette. $n+1$, primordium en cours de formation; n , primordium de rang n ; $sf-5$, segment foliaire du primordium de rang $n-5$.

$n-4$, et $n-9$; $n-5$ et $n-10$; $n-1$, $n-6$ et $n-11$; $n-2$ et $n-7$; $n-3$ et $n-8$ (voir Pl. I, fig. b, et fig. 12).

L'examen de sections sériées des primordiums foliaires, effectuées dans un plan CD à peu près perpendiculaire au plan AB (voir fig. 6, CD), montre qu'il existe dans les ébauches foliaires deux cordons provasculaires (Pl. IX, fig. c, $pc1$ et $pc2$) se rejoignant, peu après leur entrée dans la tige, en un faisceau unique (pc). Ce faisceau se ramifie en plusieurs branches : quatre ramifications entrent en connexion avec les faisceaux procambiaux des quatre racines toujours dépendantes des feuilles (fig. 13, exemple pour $n-4$, $R1$ à $R4$); de plus, deux faisceaux (fig. 13, $cpb1$ et $cpb2$) se dirigent vers le méristème apical (ma) de part et d'autre du segment de la future feuille

$n+1$. Le méristème étant extrêmement aplati, la course des faisceaux est parallèle à sa surface.

La vascularisation des feuilles de rang $n+1$, n , $n-1$, $n-2$ et $n-3$ qui entourent directement le méristème est tout à fait comparable à celle qui vient d'être décrite pour $n+1$ et $n-4$. Les faisceaux (*cpb1* et *cpb2*) des segments foliaires de chacune de ces feuilles se rejoignent dans la partie supérieure de la zone 5. Ils s'élaborent en effet sous la zone d'initiation foliaire dans une zone d'initiation vasculaire (fig. 13 et 14, *ziv*). Cette zone, constituée par des cellules qui ont la forme et les caractéristiques cytologiques de cellules provasculaires, construit une sorte de cuvette. Le fond de cette

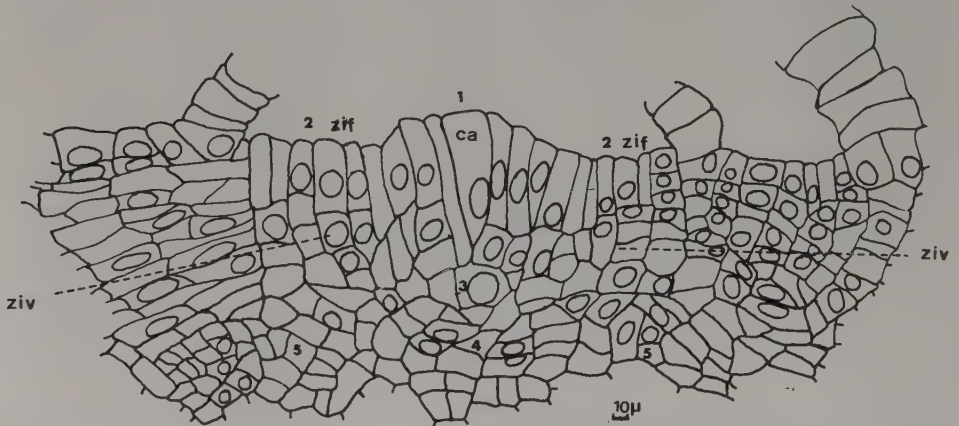


Fig. 14. — Section longitudinale axiale du méristème apical du *Pteris cretica* L. ne passant par aucun primordium. La zone d'initiation vasculaire (*ziv*) est située sous la zone d'initiation foliaire (*zif*); elle s'incurve ensuite, sous la zone 3, dont elle tapisse la base constituant alors la zone 4. *ca*, cellule apicale de l'axe; 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones apicales.

cuvette est visible sur une section longitudinale axiale : c'est la zone 4 (fig. 14, 4).

Le terme de tissu provasculaire a été ici utilisé pour décrire un tissu dont les cellules ont des caractères de cellules procambiales. Cependant, certaines cellules qualifiées de provasculaires évolueront, sans jamais donner de cellules vasculaires. Ainsi, les cellules de la zone 4 fournissent des cellules de parenchyme qui construiront la partie centrale du rhizome; elles forment ce que nous appellerons une « pseudo-moelle ». Cette zone 4 se comporte donc comme un méristème médullaire. La zone d'initiation vasculaire qui a la forme d'une cuvette correspond, en fait, à la zone pré-stéliaire de GOTTLIEB et STEEVES [28, 29], chaque « unité foliaire » est donc de double nature : elle est constituée, d'une part, par un segment foliaire précocement mis en place et vascularisé, et, d'autre part, par la partie proprement foliaire qui naît plus tardivement avec la différenciation de

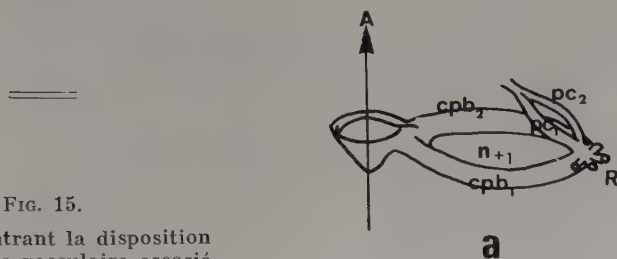


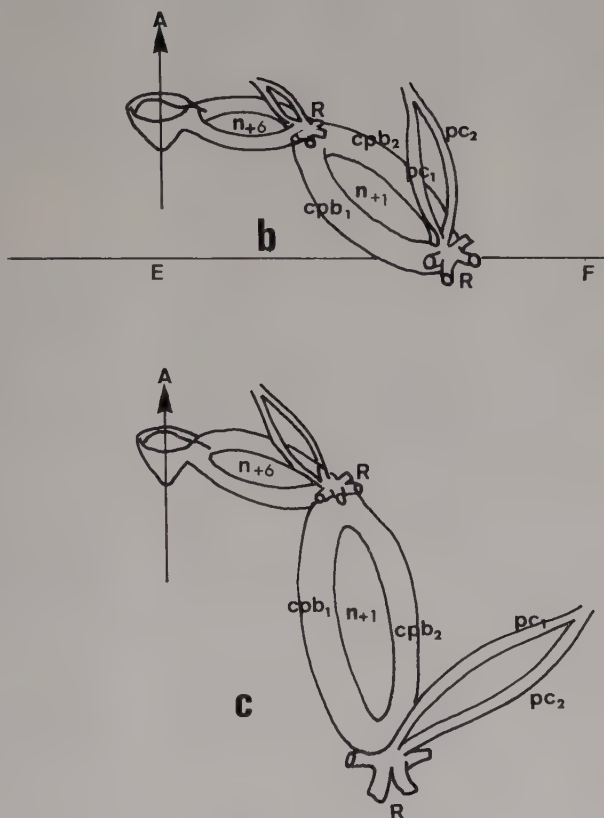
FIG. 15.

Schéma montrant la disposition du système vasculaire associé aux feuilles de rang $n+1$ et $n+6$ par rapport à l'axe A du rhizome et au cours de la croissance de celui-ci, a, b, c. cpb_1 , cpb_2 , faisceaux vasculaires parcourant le segment foliaire; pc_1 , pc_2 , faisceaux procambiaux des feuilles se rejoignant en un faisceau unique; R, faisceaux allant vers les racines.

a) Au niveau apical, le plan du système vasculaire du segment foliaire de la feuille de rang $n+1$ est perpendiculaire à l'axe A.

b) Lorsque la feuille de rang $n+1$ se forme, le plan du système vasculaire de son segment foliaire précocement formé devient oblique par rapport à l'axe A. EF, plan selon lequel a été effectuée la section présentée par la planche IX, fig. d.

c) Alors que $n+1$ s'accroît et que $n+6$ va se former, le plan du système vasculaire du segment foliaire $n+1$ est parallèle à l'axe du rhizome.



son apicale foliaire. Chaque initium foliaire proprement dit emprunte ses premières cellules vasculaires à la zone d'initiation vasculaire située en cuvette sous le dôme apical. De même les premières cellules vasculaires des faisceaux parcourant les segments foliaires sont initiées à partir de cette zone. L'ensemble « segment foliaire - primordium foliaire » a une

vascularisation dont l'origine est à la fois caulinare et foliaire. La partie proprement foliaire est prépondérante, le segment foliaire issu de la zone 2 assurant la vascularisation la plus importante.

La zone d'initiation vasculaire constitue un système provasculaire proprement caulinare qui entoure complètement le dôme apical et se situe constamment au-dessus des derniers primordiums foliaires (fig. 13, et voir fig. 21, *ziv*). De ce fait, il ne peut y avoir de continuité entre le futur parenchyme ventral de l'ébauche foliaire la dernière formée (voir fig. 21, $n+1$) et la pseudo-moelle (voir fig. 21, *pm*), continuité qui caractérise la présence d'une brèche foliaire, chez les Angiospermes, par exemple. Tou-

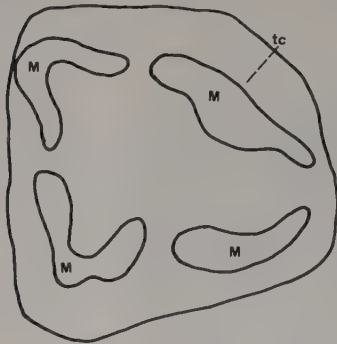


FIG. 16. — Schéma d'une section transversale d'un rhizome du *Pteris cretica* L. Les méristèmes (*M*) sont dispersés dans le tissu cortical (*tc*). Leur forme et leur faible nombre permettent de penser que de nombreuses anastomoses ont lieu sur le parcours des faisceaux. (G. $\times 10$.)

tefois, à mesure que se développe le segment foliaire, une continuité s'établit entre le parenchyme ventral des ébauches plus âgées (voir fig. 21, $n-4$, par exemple) et la pseudo-moelle (*pm*) par la partie centrale du segment foliaire (*sf+1*). Cette portion du segment foliaire, délimitée par l'anneau vasculaire (*cpb1* et *cpb2*) pourrait être assimilée à une fenêtre foliaire.

Sur une section transversale effectuée au niveau de la cellule apicale (voir Pl. I, fig. b), le massif apical est entouré par la zone d'initiation vasculaire (Pl. I, fig b, *ziv*). Les sections des segments foliaires des primordiums et ébauches de rang n ($n-1$ à $n-8$) sont enveloppées par du tissu procambial (*pc*). Ce tissu correspond aux faisceaux (*cpb1* et *cpb2*), qui parcourent le segment foliaire de chaque ébauche. Des rapports vasculaires s'établissent entre les feuilles initiées dans un même plan, soit par exemple $n+1$ et $n-4$, n et $n-5$ (voir fig. 13 et Pl. I, fig. b). Mais une contiguïté

vasculaire existe aussi entre les feuilles $n-1$, $n-4$ et $n-7$; n , $n-3$ et $n-6$; $n+1$, $n-2$ et $n-5$, feuilles situées respectivement sur un système de 3 parastiques (voir Pl. I, fig. b et fig. 12, *flèches*). A mesure que le rhizome s'accroît, les feuilles déjà formées sont repoussées progressivement vers une partie plus âgée (fig. 15 a, b et c). Le plan des anneaux vasculaires (fig. 15 a) formés par les cordons *cpb1* et *cpb2* de segments de chacune des jeunes feuilles est tout d'abord perpendiculaire à l'axe du rhizome A. Lorsque $n+1$ s'accroît (fig. 15 b), le plan de l'anneau vasculaire de son segment foliaire devient oblique par rapport à l'axe du rhizome. Sur une section transversale (Pl. IX, fig. d) effectuée selon le plan EF indiqué sur la figure 15 b, on observe seulement la partie inférieure des anneaux vasculaires des feuilles de rang $n+1$ à $n-4$. Ces anneaux sont en contiguïté. Alors que $n+1$ s'accroît et que $n+6$ va se former au niveau apical, le

plan de l'anneau vasculaire du segment foliaire de rang $n+1$ (fig. 15 c) devient parallèle à la surface du rhizome ainsi qu'à son axe.

Une section transversale effectuée à un niveau quelconque du rhizome, mais loin du méristème (fig. 16), montre la présence de méristèles (*M*) dispersées dans le tissu cortical. Chaque méristèle est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur, par un péricycle, un tissu criblé et du xylème central. Elle provient de la différenciation d'un faisceau procambial.

Les feuilles peuvent s'inscrire sur un système de cinq orthostiques comme nous l'avons vu précédemment. Selon le schéma de la formation du système vasculaire au niveau apical, qui a été décrit plus haut, les feuilles situées sur une même orthostique, ont leur système vasculaire en contiguïté. Cinq ensembles vasculaires s'édifient donc progressivement. Chaque segment foliaire possédant un double cordon, on devrait retrouver dans le rhizome différencié dix méristèles. On en décèle, en réalité, trois ou quatre. Leur faible nombre et leur forme souvent irrégulière en section transversale prouvent que des anastomoses vasculaires se sont effectuées durant la course des faisceaux.

3° Valeur de la zone d'initiation foliaire ou zone 2.

La zone 2, ou zone d'initiation foliaire, qui entoure le dôme apical est constituée par des cellules qui présentent les caractères les plus méristématiques de tout l'apex. Elle subit, de plus, des variations importantes en fonction des diverses phases du plastochrone. De 300 μ de largeur lorsque l'apicale d'une nouvelle feuille va s'individualiser, elle se réduit à 80 μ seulement lorsqu'un nouveau primordium vient de surgir. Sous cette zone peu épaisse, dans laquelle naissent les feuilles, se trouve la « zone d'initiation vasculaire » dans laquelle se différencie le tissu vasculaire en rapport avec les feuilles. La zone d'initiation foliaire est donc analogue, par son fonctionnement, à l'anneau initial défini par PLANTEFOL [53]. Mais, la présence d'un anneau initial implique l'existence d'hélices foliaires. En effet, l'anneau initial est une zone subapicale, au niveau de laquelle aboutissent les hélices foliaires. Ces hélices relient entre elles les feuilles qui sont nées en contiguïté les unes avec les autres; elles tournent autour de l'axe de la tige et déterminent à leur point d'arrivée dans l'anneau initial un « lieu » d'initiation. PENON [50], en 1951, a essayé par des observations morphologiques de démontrer la présence d'hélices foliaires chez les Filicinaées. Ses études ont conclu à la grande probabilité d'existence d'un nombre restreint d'hélices foliaires.

Chez le *Pteris*, sur les schémas phyllotaxiques établis à partir d'une succession de sections transversales du méristème apical, on peut tracer une spire reliant toutes les feuilles (fig. 6) et un système de deux (fig. 12, *flèches en pointillés*) ou de trois (fig. 12, *flèches*) parastiques ou bien encore de cinq orthostiques (fig. 12, *flèches en tirets*).

Des rapports de contiguïté, qui s'établissent par l'intermédiaire des anneaux de procambium entourant les bases foliaires, existent entre les feuilles qui viennent de naître, situées sur les mêmes génératrices des systèmes à trois parastiques ou à cinq orthostiques (fig. 12, *flèches et flèches en tirets*). Trois ou cinq hélices foliaires pourraient donc exister. Le système le plus simple devant être retenu, on peut donc penser que, chez le *Pteris*, les feuilles naissent le long de trois hélices foliaires. Trois foyers d'initiation, lieux d'arrivée de ces trois hélices devraient théoriquement être visibles au niveau du méristème; mais seule l'activité cellulaire due à la formation d'un primordium est reconnaissable sur des sections transversales. Cette anomalie peut être expliquée par le grand laps de temps qui sépare l'initiation de deux feuilles successives dans un méristème volumineux, ainsi que par la brièveté et la superficialité des processus de mise en place d'un nouveau primordium. La grande probabilité d'existence de ces hélices foliaires permet donc de dire que la zone d'initiation foliaire est un anneau initial.

La présence d'une apicale trifaciale pouvait faire penser à un fonctionnement comparable à celui décrit chez les Bryophytes [33]. En effet, chez ces végétaux, l'apicale, par les divisions rythmiques et successives de ses trois faces, met en place des segments qui engendrent chacun une feuille. C'est donc la cellule apicale, elle-même, qui établit les trois séries foliaires. Ces phénomènes, très schématiques chez les Mousses, auraient pu être masqués chez les Ptéridophytes par la taille même du méristème.

La présence très probable, chez le *Pteris*, de trois hélices foliaires rapproche le fonctionnement du méristème de cette plante de celui des Végétaux supérieurs. Toutefois, elle ne résout pas, en l'excluant, le problème du rôle joué par la cellule apicale. Dans un tel fonctionnement, en effet, l'apicale pourrait être « l'organisateur » qui harmonise l'activité des divers centres générateurs. Chaque face de l'apicale serait plus particulièrement en corrélation avec un centre générateur, donc avec une hélice foliaire.

4° Résultats histoautoradiographiques.

Pour contrôler les résultats obtenus par les méthodes histocytologiques classiques et pour mieux décrire le comportement du méristème, non seulement lors de la formation des feuilles mais aussi dans les relations qui existent entre ses différentes zones, une étude dynamique, après incorporation des précurseurs des acides nucléiques marqués au tritium, a été réalisée.

a) *Incorporation de thymidine tritiée.* — Comportement des diverses zones du méristème et des cellules de la zone 2, situées à l'aisselle des primordiums de rang n ou $n-1$. — Le tableau IV présente les pourcentages de noyaux marqués dans les diverses zones du méristème apical après

une incorporation de 8 heures. Les comptages sont effectués sur des sections longitudinales qui montrent, pour la zone 2, l'activité des secteurs situés à l'aisselle des primordiums de rang n (Pl. X, fig. d) ou $n-1$ (Pl. X, fig. c).

TABLEAU IV. — POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS DANS LES DIVERSES ZONES APICALES (1 A 5) DÉTERMINÉS SUR VINGT MÉRISTÈMES ADULTES APRÈS INCORPORATION DE THYMINÉ TRITIÉE DURANT 8 HEURES.

	ZONE 1		ZONE 2 à l'aisselle de n ou $n-1$	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	apicale	dérivées				
Nombre de noyaux marqués.	1	16	60	20	76	76
Nombre de noyaux non marqués.	19	272	476	316	360	1 096
Nombre total de noyaux.	20	288	536	336	436	1 172
Pourcentage de noyaux marqués.	5	5,55	11,19	5,95	17,43	6,48

Les différences enregistrées entre les pourcentages de noyaux marqués dans les zones 1 et 2, 1 et 3 et 1 et 4, évaluées par la méthode du χ^2 , sont présentées respectivement par les tableaux V, VI et VII.

TABLEAUX V, VI ET VII. — TABLEAUX DE CONTINGENCE PERMETTANT DE COMPARER, PAR LE TEST DU χ^2 , LES DIFFÉRENCES DE POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS, APRÈS INCORPORATION DE THYMINÉ TRITIÉE DURANT 8 HEURES. $\chi^2 > 3,84$: significatif.

TABLEAU V. — COMPARAISON ENTRE LES ZONES 1 ET 2 A L'AISELLE DES FEUILLES DE RANG n OU $n-1$.

	ZONE 1 (dérivées)	ZONE 2 à l'aisselle de n ou $n-1$
Nombre de noyaux marqués	16	60
Nombre de noyaux non marqués	272	476
Nombre total de noyaux	288	536
$\chi^2 = 7,09$		

TABLEAU VI. — COMPARAISON ENTRE LES ZONES 1 ET 3.

	ZONE 1 (dérivées)	ZONE 3
Nombre de noyaux marqués	16	20
Nombre de noyaux non marqués	272	316
<i>Nombre total de noyaux</i>	288	336
$\chi^2 = 0,0436$		

TABLEAU VII. — COMPARAISON ENTRE LES ZONES 1 ET 4.

	ZONE 1 (dérivées)	ZONE 4
Nombre de noyaux marqués	16	76
Nombre de noyaux non marqués	272	360
<i>Nombre total de noyaux</i>	288	436
$\chi^2 = 22,02$		

Ces résultats montrent que les synthèses d'ADN sont plus fréquentes dans les cellules de la zone 2 situées à l'aisselle des ébauches de rang n ou $n-1$ que dans celles de la zone 1. La cellule apicale incorpore très rarement le marqueur; en effet, une seule cellule apicale sur les 20 examinées a

PLANCHE X

FIG. a, b, c et d. — Histoautoradiographies du méristème apical du *Pteris cretica* L. après incorporation de thymidine tritiée (concentration 30 $\mu\text{Ci/ml}$; activité spécifique 4Ci/mM); fig. a et b durant 8 heures et fig. c et d durant 30 heures. (G. $\times 380$.)

a) Après 8 heures d'incorporation, les noyaux marqués sont préférentiellement répartis dans la zone 2 et à la base du dôme apical (*flèches*). *ca*, cellule apicale; 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones apicales.

b) Dans les faisceaux procambiaux (*pc*), les noyaux marqués sont préférentiellement ceux des cellules périphériques (*flèches*).

c) Après 30 heures d'incorporation, les noyaux des cellules de la zone 1 sont marqués. Noter le faible marquage du noyau de l'apicale (*ca*). 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones apicales.

d) Après 30 heures d'incorporation, les noyaux des cellules de la zone 2 situés à l'aisselle du dernier primordium formé (*Pn*) sont très fréquemment radioactifs.

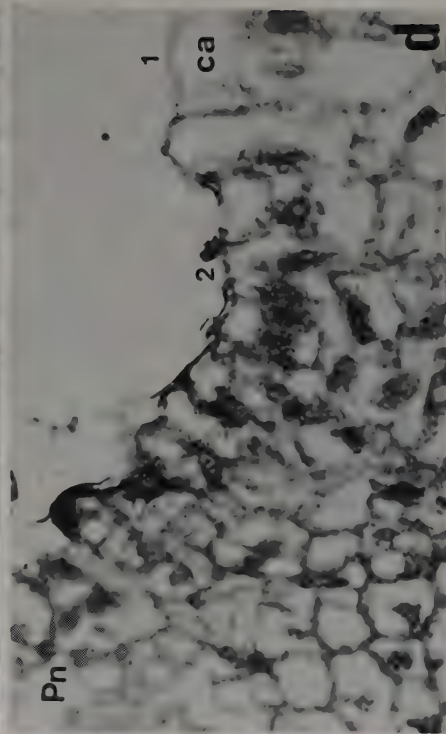
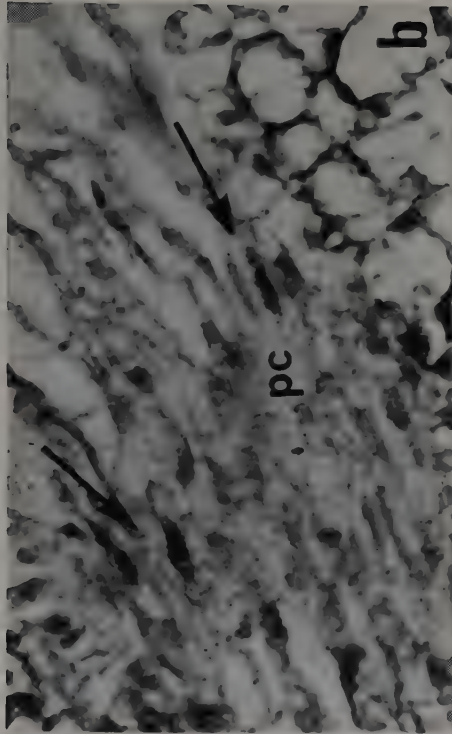
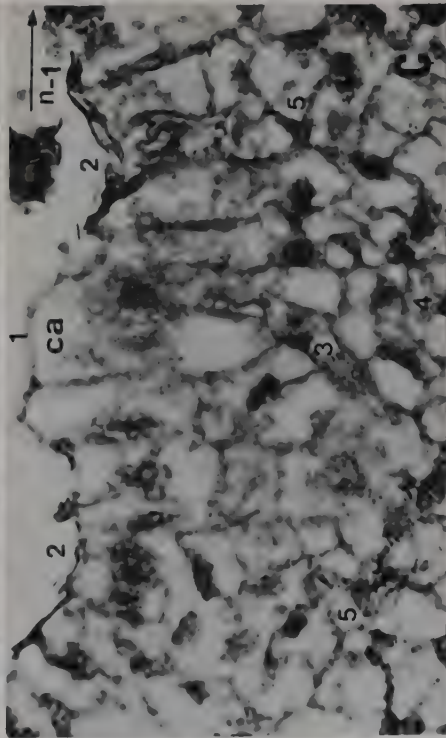
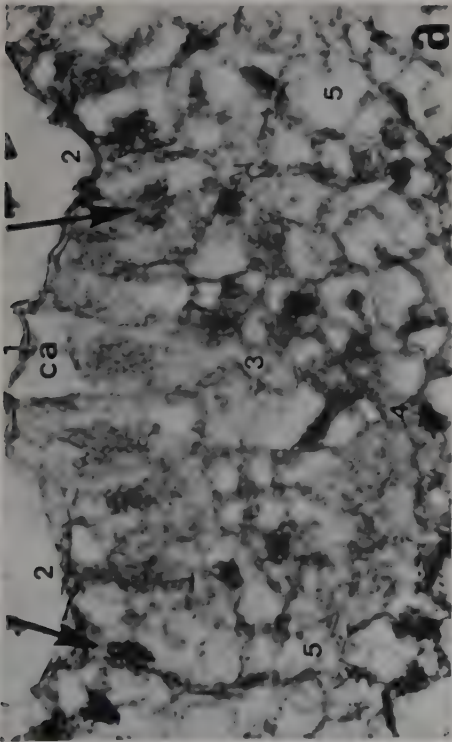


PLANCHE X

montré un noyau radioactif. De plus, les cellules de la zone 1 dont les noyaux sont marqués se situent préférentiellement à la base du dôme axial et non au voisinage de l'apicale elle-même (Pl. X, fig. a, *flèches*). Les pourcentages de noyaux marqués dans les zones 1 et 3 sont tout à fait comparables et la faible différence enregistrée ne peut être significative (tableau VI). C'est dans la zone 4 que le pourcentage de noyaux marqués est le plus élevé et que les synthèses d'ADN sont donc les plus fréquentes. Ainsi, il existe, depuis la cellule apicale jusqu'aux cellules de la zone 2, d'une part, et depuis la cellule apicale jusqu'aux cellules des zones 3 et 4, d'autre part, un gradient selon lequel les synthèses d'ADN deviennent de plus en plus fréquentes.

Plusieurs auteurs ont montré [13, 46, 48], aussi bien dans les tissus animaux que végétaux, que des synthèses d'ADN peuvent se produire dans des cellules qui ne se divisent plus. Ces synthèses sont interprétées soit comme un renouvellement total ou partiel de l'ADN, soit comme une duplication répétée provoquant une endopolyploïdie. Afin de préciser si les synthèses d'ADN enregistrées sont bien les prémices de nouvelles divisions, la valeur de l'index mitotique a été déterminée pour chacune des zones apicales. Le tableau VIII présente la valeur de ces index.

TABLEAU VIII. — POURCENTAGES DE NOYAUX EN MITOSE DANS LES DIVERSES ZONES APICALES. Evaluations établies sur vingt méristèmes.

	ZONE 1		ZONE 2 à l'aisselle de n ou n-1	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	apicale	dérivées				
Nombre de noyaux en mitose.	0	11	47	16	80	21
Nombre de noyaux quiescents.	20	370	607	441	550	1 371
Nombre total de noyaux.	20	381	654	457	630	1 392
Pourcentage de noyaux en mitose.	0	2,88 ≈ 2,9	7,19 ≈ 7,2	3,5	12,69 ≈ 12,7	1,508 ≈ 1,5

Les valeurs obtenues sont dans tous les cas plus faibles que les pourcentages de noyaux marqués enregistrés après incorporation de thymidine tritiée (tableau IX). En effet, l'index mitotique dépend du rapport qui existe entre la durée de la mitose et la durée totale du cycle, alors que le

pourcentage de noyaux marqués, après une incorporation, dépend du rapport existant entre la durée de la phase de synthèse et la durée totale du cycle. Lorsque la durée de la mitose est plus courte que celle de la phase de synthèse, il est normal que l'index mitotique soit plus faible que le pourcentage de noyaux marqués.

TABLEAU IX. — COMPARAISON, DANS LES DIVERSES ZONES APICALES, DES POURCENTAGES DE NOYAUX EN MITOSE ET DES POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS APRÈS INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIÉE DURANT 8 HEURES.

	ZONE 1		ZONE 2 à l'aisselle de n ou n-1	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	apicale	dérivées				
Valeur des index mitotiques.	0	2,9	7,2	3,5	12,7	1,5
Pourcentage de noyaux marqués après 8 h d'incor- poration.	5	5,55	11,19	5,95	17,4	6,48

De plus, ces deux séries de valeurs ne sont réellement comparables entre elles que dans la mesure où les pourcentages de noyaux radioactifs sont déterminés sur des échantillons ayant subi une incorporation très brève. Huit heures n'est pas un temps très bref, il a été choisi parce qu'il permettait d'obtenir un nombre de noyaux marqués suffisamment élevé dans toutes les zones du méristème. Avec des temps d'incorporation plus courts, les noyaux radioactifs sont, ou bien répartis seulement en superficie, ou bien totalement absents.

Le tableau IX établit la comparaison entre les index mitotiques et les pourcentages de noyaux marqués dans les diverses zones apicales. Dans les zones 1, 2, 3 et 4, les pourcentages de cellules en mitose varient dans le même sens que les pourcentages de noyaux marqués. Pour ces quatre zones, on peut donc penser que la plupart des synthèses décelées sont bien l'indice de futures mitoses.

Si 5 % de cellules apicales incorporent le précurseur radioactif, aucune cellule apicale n'a été observée en cours de division. Ces faits pourraient amener à conclure que les synthèses mises en évidence dans les cellules apicales ne sont pas suivies de mitose. Mais l'erreur absolue commise sur des pourcentages établis sur vingt échantillons, donc sur vingt cellules apicales est au moins de 10 %. La comparaison de ces

résultats n'est donc pas possible. De plus, la durée de la mitose est toujours assez courte (de l'ordre de quelques heures); si la durée totale du cycle mitotique de la cellule apicale est très longue, les chances pour observer cette cellule en cours de division sont *très faibles*.

Ces résultats permettent seulement de dire que la durée du cycle mitotique de la cellule apicale est plus longue que celle de toutes les cellules du méristème. Dans les cellules de la zone 1, puis dans celles de la zone 2, la durée du cycle devient de plus en plus courte. Une cellule issue de l'apicale et qui appartient à la zone 1 est repoussée vers la zone 2 tandis qu'elle se recloisonne. Au cours de ces phénomènes, son cycle mitotique se raccourcit de plus en plus.

Les cellules de la zone 4 sont celles qui incorporent le plus la thymidine tritiée et qui se divisent le plus. *Ces cellules forment un méristème médullaire*.

Sous la zone 4, sur une hauteur de 200 à 250 μ , on rencontre fréquemment des noyaux marqués dans le tissu parenchymateux qui constitue la zone 5. Le tableau IX montre que 6,48 % des noyaux sont radioactifs après une incorporation de 8 heures. L'intensité du marquage est, à ce niveau, toujours plus forte que dans les autres zones apicales. Mais, les cellules de la zone 5 ont commencé à se différencier, elles sont très fortement vacuolisées et leur noyau, très colorable après la réaction de FEULGEN (Pl. III, fig. a, 5), est déjà souvent rejeté contre la paroi cellulaire. De plus, l'index mitotique est très faible dans cette zone puisqu'il n'atteint que 1,5 (voir tableau IX). Les cellules de la zone 5 ne se divisent donc plus de façon active. La majorité des synthèses d'ADN mises en évidence dans cette zone n'est donc pas l'indice de futures mitoses.

D'AMATO [13, 14] a montré que de nombreuses cellules appartenant à des tissus différenciés étaient polyploïdes. Cette polyploïdie, acquise par endoduplication, s'établirait généralement au début de la différenciation [13]. Les synthèses d'ADN décelées dans la zone 5 pourraient donc correspondre aux dernières synthèses se produisant au début de la phase de différenciation. Les noyaux de cette zone se différencieraient en état de postsynthèse, leur cycle se trouvant bloqué en G_2 ; ils seraient donc au moins tétraploïdes. Des mesures cytophotométriques quantitatives permettront de vérifier cette hypothèse. La zone 5 matérialise donc la zone « sub-apicale » ou zone de différenciation de WARDLAW [77].

Dans les faisceaux procambiaux, les synthèses d'ADN sont préférentiellement localisées au niveau des cellules périphériques (Pl. X, fig. b, *flèches*). Ces synthèses nouvelles annoncent soit des divisions cellulaires responsables d'un accroissement en épaisseur des cordons vasculaires, soit le début de la différenciation en un péri-cycle de ces cellules, alors en postsynthèse. Le premier phénomène est prédominant auprès de la zone apicale, le second s'installe dans les cordons plus âgés.

Les pourcentages des noyaux marqués dans les zones apicales après 30 heures d'incorporation sont présentés par le tableau X.

TABLEAU X. — POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS DANS LES DIVERSES ZONES APICALES, DÉTERMINÉS SUR VINGT MÉRISTÈMES APRÈS UNE INCORPORATION DE THYMINES TRITIÉES DURANT 30 HEURES.

	ZONE 1		ZONE 2 à l'aisselle de n ou n-1	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	apicale	dérivées				
Nombre de noyaux marqués.	1	56	212	100	176	248
Nombre de noyaux non marqués.	19	200	218	292	280	900
Nombre total de noyaux.	20	256	430	392	456	1 148
Pourcentage de noyaux marqués.	5	21,87	49	25,5	38,6	21,60

Ces résultats montrent qu'une augmentation du temps de contact avec le traceur provoque, dans toutes les zones cellulaires, une augmentation du pourcentage de noyaux marqués. Au niveau de la zone 1, non seulement les noyaux radioactifs sont plus nombreux, mais ils ne sont plus préférentiellement situés à la base du dôme axial; les cellules voisines de la cellule apicale peuvent aussi être marquées (Pl. X, fig. c). Seul le pourcentage de cellules apicales radioactives ne varie pas, mais étant donné qu'il n'y a qu'une seule apicale par méristème, les variations des pourcentages obtenus sur 20 échantillons ne sont pas statistiquement valables.

Comme dans le cas d'une incorporation de 8 heures, les différences enregistrées entre les pourcentages de noyaux marqués dans les zones 1 et 2, 1 et 3, 1 et 4 ont été évaluées par la méthode du χ^2 (voir tableaux XI, XII et XIII). Les différences significatives qui existent dans les pourcentages de noyaux marqués entre les zones 1 et 2 prouvent que les cellules de la zone 1 et celles de la zone 2 constituent deux ensembles de comportement différent.

Pour la zone 2, les pourcentages de noyaux marqués précédemment notés après 8 ou 30 heures d'incorporation (tableaux IV et X) ne représentent que l'activité moyenne des cellules à l'aisselle des ébauches de rang n ou n-1. En fait, toutes les cellules de la zone 2 qui entourent le dôme apical n'ont pas une activité identique de synthèse de l'ADN.

TABLEAUX XI, XII ET XIII. — TABLEAUX DE CONTINGENCE PERMETTANT DE COMPARER, PAR LE TEST DU χ^2 , LES DIFFÉRENCES DE POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS, ENREGISTRÉES APRÈS UNE INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIÉE DURANT 30 HEURES. $\chi^2 > 3,84$: significatif.

TABLEAU XI. — COMPARAISON ENTRE LES ZONES 1 ET 2

	ZONE 1 (dérivées)	ZONE 2 à l'aisselle de n ou n-1
Nombre de noyaux marqués	56	212
Nombre de noyaux non marqués	200	218
<i>Nombre total de noyaux</i>	256	430
$\chi^2 = 47,35$		

TABLEAU XII. — COMPARAISON ENTRE LES ZONES 1 ET 3

	ZONE 1 (dérivées)	ZONE 3
Nombre de noyaux marqués	56	100
Nombre de noyaux non marqués	200	292
<i>Nombre total de noyaux</i>	256	392
$\chi^2 = 1,10$		

TABLEAU XIII. — COMPARAISON ENTRE LES ZONES 1 ET 4

	ZONE 1 (dérivées)	ZONE 4
Nombre de noyaux marqués	56	176
Nombre de noyaux non marqués	200	280
<i>Nombre total de noyaux</i>	256	456
$\chi^2 = 20,53$		

Comportement des cellules de la zone 2, situées à l'aisselle des primordiums et ébauches de rang n à n-4. — Le tableau XIV présente les pourcentages de noyaux marqués après 8 heures et 30 heures d'incorporation,

TABLEAU XIV. — COMPARAISON DES INDEX MITOTIQUES ET DES POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS APRÈS UNE INCORPORATION DE THYMINES TRITIÉES DURANT 8 HEURES ET 30 HEURES POUR LES CELLULES DE LA ZONE 2, SITUÉES RESPECTIVEMENT À L'AISELLE DES ÉBAUCHES DE RANG n , $n-1$, $n-2$, $n-3$ et $n-4$.

ZONE 2 à l'aiselle de	POURCENTAGE DE NOYAUX MARQUÉS APRÈS UNE INCORPORATION DE 8 HEURES	POURCENTAGE DE NOYAUX MARQUÉS APRÈS UNE INCORPORATION DE 30 HEURES	INDEX MITOTIQUE
n	16,66	60,50	9,06
$n-1$	8,14	39,06	5,39
$n-2$	—	28,41	4,6
$n-3$	—	14,24	3,72
$n-4$	—	5,03	1,80

ainsi que la valeur des index mitotiques pour la zone 2, à l'aiselle respectivement des primordiums et des ébauches de rang n à $n-4$. On voit que l'activité de synthèse de l'ADN varie selon les secteurs étudiés.

Ces résultats montrent qu'à l'aiselle de la feuille, n , qui vient de naître, plus de 60 % des cellules de la zone 2 sont marquées (Pl. X, fig. d), alors qu'à l'aiselle des ébauches plus âgées, ces pourcentages diminuent progressivement. Les χ^2 calculés pour n et $n-1$ sont significatifs (voir tableau XV). Cela veut dire que l'activité de synthèse des cellules de la zone latérale, très intense entre le dôme apical et la feuille la dernière formée, diminue progressivement dans les secteurs situés à l'aiselle des feuilles de plus en plus âgées. La valeur des index mitotiques (voir tableau XIV) permet de penser que ces synthèses d'ADN sont les prémices de futures divisions. On peut donc affirmer que la durée du cycle mitotique des cellules du secteur n est la plus courte. Cette durée est de plus en plus longue dans les cellules situées à l'aiselle des primordiums et ébauches de rang $n-1$ à $n-4$.

TABLEAU XV. — TABLEAU DE CONTINGENCE PERMETTANT DE COMPARER, PAR LE TEST χ^2 , LES POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS APRÈS 30 HEURES D'INCORPORATION DES CELLULES DE LA ZONE 2, À L'AISELLE DES ÉBAUCHES DE RANG n ET $n-1$.

	ZONE 2 à l'aiselle de n	ZONE 2 à l'aiselle de $n-1$
Nombre de noyaux marqués	72	100
Nombre de noyaux non marqués	47	156
<i>Nombre total de noyaux</i>	119	256
$\chi^2 = 15,02$		

Examinons maintenant, en fonction des résultats précédents, le devenir au cours du temps d'un secteur particulier, *n*. Tandis qu'apparaissent des feuilles nouvelles, les cellules du secteur *n* vont, en se multipliant, passer progressivement de l'état de synthèse de « *n* » à l'état de synthèse de « *n-1* », « *n-2* », « *n-3* » puis « *n-4* ». Ce secteur s'accroît donc en devenant de moins en moins actif. Lorsque quatre autres feuilles sont nées dans d'autres plans, *n+5* se forme dans le secteur « *n* » en avant de l'ébauche nommée *n*. Les cellules situées en avant de *n+5* reprennent alors brusquement l'état de synthèses qu'elles possédaient entre l'apicale et *n*.

Comportement des primordiums foliaires. — Dans les primordiums foliaires, les incorporations et les mitoses se situent principalement dans les cellules du faisceau procambial, dans la cellule apicale et dans ses dérivées immédiates (Pl. XI, fig. a). La croissance du primordium est donc due essentiellement à l'activité des cellules distales. Après 8 heures d'incorporation, sur quarante-cinq apicales foliaires observées, treize montrent un noyau radioactif, soit 28,8 %. Après 30 heures, dix-huit apicales foliaires sur quarante, soit 45 %, possèdent un noyau marqué.

Ces pourcentages, bien supérieurs à ceux calculés pour la cellule apicale de l'axe, semblent indiquer que la durée du cycle mitotique de la cellule apicale du primordium ou de l'ébauche foliaire est beaucoup plus courte que celle de la cellule apicale de la tige. Ce résultat va de pair avec l'aspect plus méristématique et le rapport nucléoplasmique plus élevé de la cellule apicale foliaire par rapport à ceux de la cellule apicale de l'axe

PLANCHE XI

FIG. a. — Histoautoradiographie d'un primordium foliaire de rang *n*, après incorporation de thymidine tritiée durant 8 heures. Le noyau de la cellule apicale (*caf*) est marqué ainsi que quelques noyaux des cellules du faisceau procambial (*pc*). (G. $\times$ 380.)

FIG. b, c, d, e et f. — Histoautoradiographies du méristème apical après incorporation d'uridine tritiée (concentration 30 μ Ci/ml, activité spécifique 4 Ci/mM) durant 3 heures.

b) Après une remise en culture de 2 heures, les cellules de la zone latérale, ou zone 2, ont leur nucléole marqué. Ici, dans une cellule de cette zone, dont le noyau renferme deux nucléoles (*flèches*), les deux nucléoles sont radioactifs. (G. $\times$ 1 640.)

c) Après une remise en culture de 5 heures, le nucléole de l'apicale (*ca*) est marqué, son noyau est faiblement radioactif. (G. $\times$ 660.)

d) Après une remise en culture de 5 heures, les noyaux des cellules de la zone latérale, ou zone 2, sont uniformément marqués. (G. $\times$ 660.)

e) Après une remise en culture de 9 heures, le marquage nucléaire de la cellule apicale est intense et homogène. (G. $\times$ 660.)

f) Après une remise en culture de 2 heures, la cellule apicale (*caf*) du primordium foliaire de rang *n-1* est marquée aux niveaux nucléaire et nucléolaire (*flèche*). Dans les cellules voisines de l'apicale et dans les cellules procambiales, le marquage est nucléaire et cytoplasmique, les nucléoles ne sont plus soulignés par le marquage. (G. $\times$ 380.)

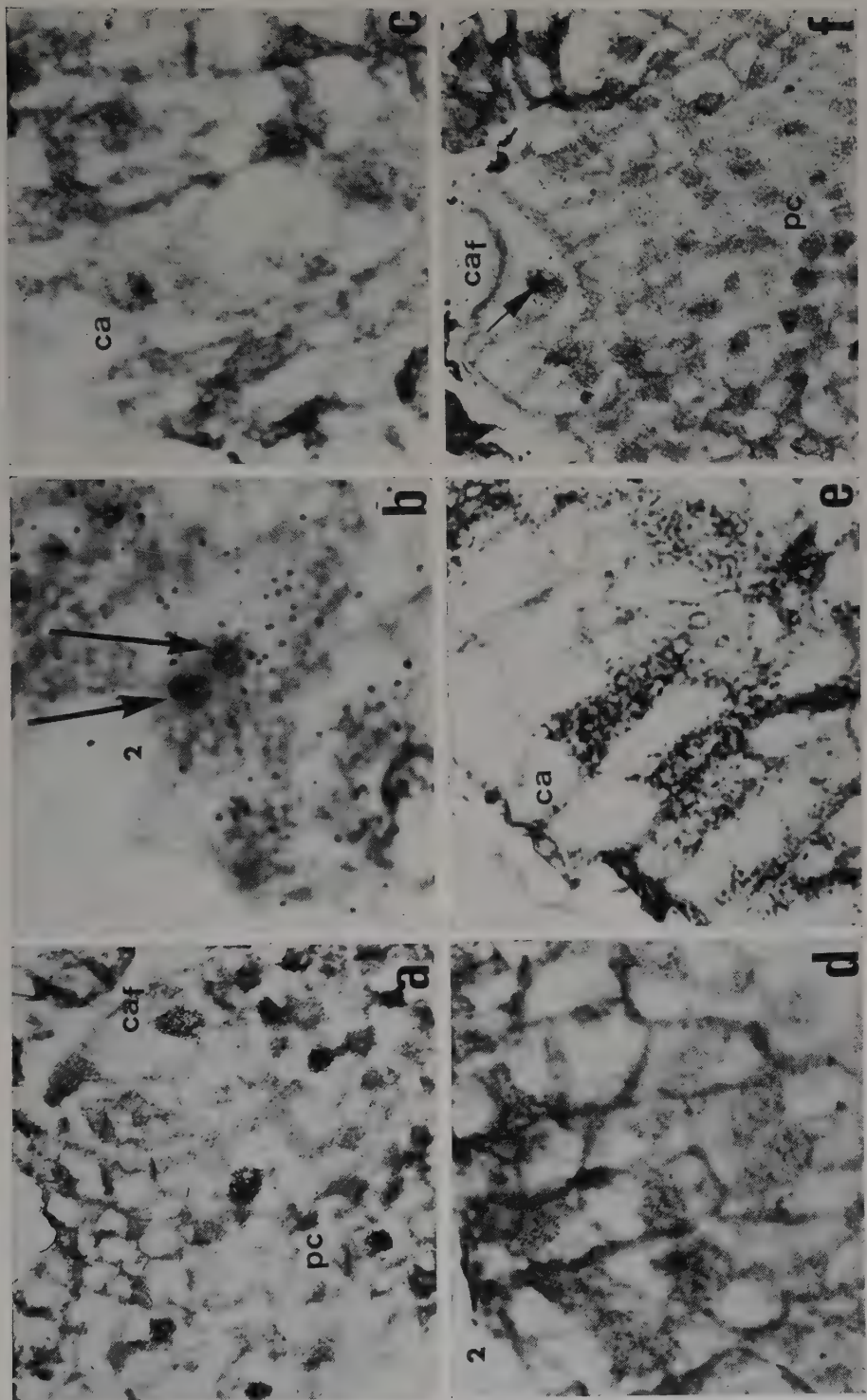


PLANCHE XI

(voir Pl. VIII, fig. d, *caf*, et Pl. I, fig. d, *ca*). De plus, il est intéressant de constater que le marquage de la cellule apicale de la tige, lorsqu'il existe, est très faible par rapport à celui décelable dans le noyau d'une apicale foliaire (comparer Pl. X, fig. c, et Pl. XI, fig. a).

b) Incorporation d'uridine tritiée. — L'uridine tritiée permet de marquer les ARN synthétisés dans le méristème durant le temps de l'incorporation. Si après la période d'incorporation et avant la fixation, ces méristèmes sont remis en culture sur un milieu non radioactif durant des temps variables, le cheminement de l'ARN marqué dans la cellule peut être suivi. Le métabolisme des différents ARN ainsi que leurs lieux de synthèse sont encore très controversés. Trois catégories d'ARN fonctionnels ont été mises en évidence [18] : l'ARN ribosomal, présent dans des granules sur lesquels s'effectuent les synthèses protéiques et que l'on décèle essentiellement dans le cytoplasme; l'ARN messenger qui, par sa structure, transmet, depuis l'ADN nucléaire jusqu'aux ribosomes cytoplasmiques, un code spécifique de la synthèse de chaque protéine; enfin, les ARN solubles ou ARN de transfert, spécifiques de chaque acide aminé, qui transportent ces amino-acides à l'emplacement déterminé qu'ils doivent occuper dans la séquence protéique, emplacement dicté par la séquence de l'ARN messenger. Cependant, la technique de centrifugation en gradient de densité a permis l'isolement de bien plus de trois types d'ARN. De ce fait, certains ARN ont été considérés comme les précurseurs d'un de ces trois types. L'ARN 45 S, par exemple, est le précurseur de l'ARN ribosomal [49]. Si la plupart des chercheurs sont d'accord pour admettre que l'ARN messenger est synthétisé au niveau de l'ADN nucléaire, par contre les lieux de synthèse de l'ARN ribosomal et des ARN solubles sont très discutés. Certains auteurs pensent, à la suite d'expériences d'hybridation [9, 25], que la synthèse de l'ARN ribosomal s'effectue au niveau de la chromatine nucléaire. Cet ARN ribosomal serait ensuite, seulement, stocké au niveau nucléolaire. Plus récemment, cependant, la présence de chromatine intranucléolaire [30] et la composition en bases, très comparables, de l'ADN intranucléolaire, de l'ARN nucléolaire et de l'ARN ribosomal [31], ont conduit de nombreux auteurs [31, 51, 52] à admettre que le précurseur de l'ARN ribosomal, l'ARN 45 S, est bien synthétisé au niveau nucléolaire. La quantité d'ADN intranucléolaire paraît en effet suffisante pour contenir les cistrons nécessaires au codage des ARN ribosomaux [18, 52]. La transformation de cet ARN 45 S en ARN cytoplasmique 28 S s'effectuerait dans le noyau [49].

Comportement des diverses zones apicales. — Dans le méristème du *Pteris*, si la thymidine tritiée n'est incorporée que rarement et faiblement au niveau du noyau de la cellule apicale, l'uridine tritiée, par contre, est toujours incorporée (Pl. XI, fig. b, c, d, e).

Après une incorporation de 3 heures et un laps de temps de 2 heures entre la fin du traitement et la fixation, les nucléoles des cellules de la zone 2 sont marqués (Pl. XI, fig. b, *flèches*). Dans les cellules des autres

zones méristématiques, aucune radioactivité n'est décelable. Si la fixation intervient immédiatement après le temps relativement bref de l'incorporation, aucun marquage n'est repérable même au niveau des nucléoles des cellules de la zone 2.

Après une incorporation de 3 heures et un laps de temps de 5 heures entre la fin de l'expérience et la fixation, le nucléole de la cellule apicale est radioactif, tandis que le noyau ne l'est que faiblement (Pl. XI, fig. c). Dans les autres cellules du méristème (zone 2), le marquage nucléaire est homogène (Pl. XI, fig. d) et un léger marquage cytoplasmique est repérable.

Dans la cellule apicale, 5 heures après l'incorporation, l'ARN synthétisé durant la période de contact avec le traceur se trouve donc essentiellement localisé au niveau nucléolaire. Dans les autres cellules, cet ARN est préférentiellement localisé au niveau nucléaire et il commence à être décelable dans le cytoplasme.

Après une incorporation de 3 heures et un temps de 9 heures avant la fixation, le noyau de l'apicale est fortement radioactif (Pl. XI, fig. e), un léger marquage est décelable dans les travées cytoplasmiques. Dans les cellules voisines, le noyau et le cytoplasme sont uniformément marqués. 9 heures sont donc nécessaires, après une incorporation de 3 heures, pour que, dans l'apicale, l'ARN radioactif soit décelable au niveau nucléaire.

Ces résultats montrent que :

1° L'uridine tritiée, précurseur de l'ARN, est incorporée tout d'abord au niveau nucléolaire. Ce résultat confirme donc bien le fait que l'ARN est synthétisé dans le nucléole. L'ARN radioactif migre ensuite dans le noyau, puis dans le cytoplasme.

2° Les nucléoles les plus rapidement marqués sont ceux des cellules de la zone 2. Le renouvellement de l'ARN est donc le plus rapide au niveau de ces cellules.

3° Le nucléole de la cellule apicale n'est marqué que lorsque le temps de remise en culture après l'incorporation est très long. Le renouvellement de l'ARN au niveau des cellules de la zone 1 est donc beaucoup plus lent que dans les autres cellules du méristème.

Comportement des primordiums foliaires. — Après une incorporation de 3 heures et un temps de 2 heures entre la fin du traitement par le précurseur radioactif et la fixation, les marquages sont décelables dans les primordiums foliaires au niveau des cellules procambiales et dans la cellule apicale et ses dérivées immédiates (Pl. XI, fig. f). Le nucléole et le noyau de la cellule apicale sont marqués, alors que dans les dérivées récentes de l'apicale, le cytoplasme est déjà radioactif. Le renouvellement de l'ARN est donc plus lent dans la cellule apicale que dans les cellules sous-jacentes. Mais comparée aux cellules du méristème proprement dit, la cellule apicale du primordium foliaire a un renouvellement de l'ARN beaucoup plus rapide que celui de la cellule apicale de l'axe.

De plus, de toutes les cellules de la zone apicale, les cellules des pri-

mordiums foliaires sont celles dont le renouvellement de l'ARN est le plus rapide puisque leur cytoplasme est déjà radioactif lorsque, après une incorporation de 3 heures, un laps de temps de 2 heures sépare l'incorporation de la fixation.

5° Conclusions.

Les renseignements obtenus sur le fonctionnement du méristème apical, à partir des données histocytologiques, ont été pleinement confirmés par les résultats histoautoradiographiques.

Chez le *Pteris*, la naissance d'une nouvelle feuille, $n+1$, qui a lieu dans l'anneau initial, à l'aisselle de $n-4$, est un phénomène essentiellement superficiel. Avant la formation de l'apicale foliaire, aucune activité mitotique particulière n'est décelable dans la zone latérale située à l'aisselle de la feuille de rang $n-4$ et mesurant alors 300 μ . Une apicale foliaire s'individualise par une mitose oblique survenant dans une cellule ayant préalablement augmenté de volume tout en accentuant ses caractères méristématiques. Ce phénomène provoque une activation des cellules immédiatement adjacentes qui participent au début de la construction du primordium, mais aussi des cellules de la zone latérale comprise entre la nouvelle feuille et le dôme axial. Ces cellules se divisent tout d'abord très vite, puis leur activité mitotique diminue à mesure que, dans ce plan, la zone latérale se reconstruit. *La régénération apicale est donc essentiellement due à l'activité mitotique des cellules restantes de l'anneau initial.*

Une fois formé, le primordium s'accroît surtout par l'activité de sa cellule apicale et des dérivées immédiates de celle-ci. A leur niveau, on décèle, en effet, une activité mitotique, une synthèse d'ADN et un renouvellement d'ARN intenses. Comme chez le *Marsilea* [58], *la cellule apicale foliaire a donc un rôle histogène.*

Au niveau du méristème apical de la tige, parallèlement au gradient de différenciation cytologique, il existe un gradient dans la durée du cycle mitotique. La cellule apicale se divise très peu tandis que ses cellules-filles se divisent de plus en plus vite à mesure qu'elles s'éloignent d'elle.

Les zones 1 à 4 sont interdépendantes et dérivent les unes des autres. *Il est donc bien évident qu'une cellule de la zone latérale provient en dernier ressort de la cellule apicale*, mais un très grand nombre de générations cellulaires les sépare. Au cours de la croissance, certaines cellules de la partie superficielle de la zone 5, situées immédiatement sous la zone 2, se différencient en procambium et forment les cordons provasculaires qui entourent les bases foliaires. Les autres cellules de cette zone deviennent des cellules parenchymateuses. Certaines cellules de la zone 5 semblent subir une dernière synthèse d'ADN avant leur différenciation définitive en cellules vasculaires, ou en cellules corticales.

La vitesse du renouvellement de l'ARN n'est pas la même dans toutes les cellules du méristème. Ce renouvellement ou « turn over » est le plus long au niveau de la cellule apicale.

II. — LE MÉRISTÈME APICAL DES JEUNES PLANTES

A. — *Morphologie.*

Six semaines après l'ensemencement des spores, les prothalles en cours de développement deviennent visibles à l'œil nu dans les flacons d'Erlen-

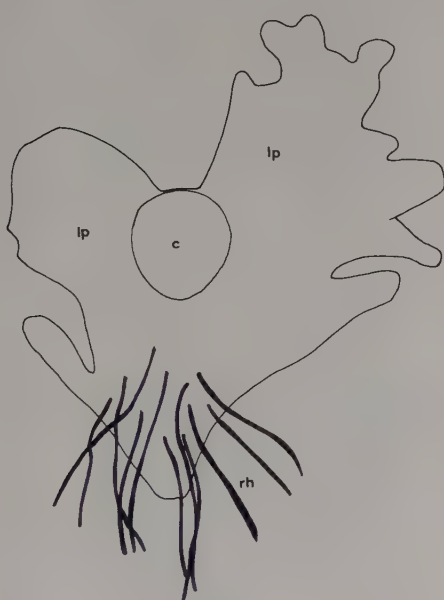


FIG. 17.

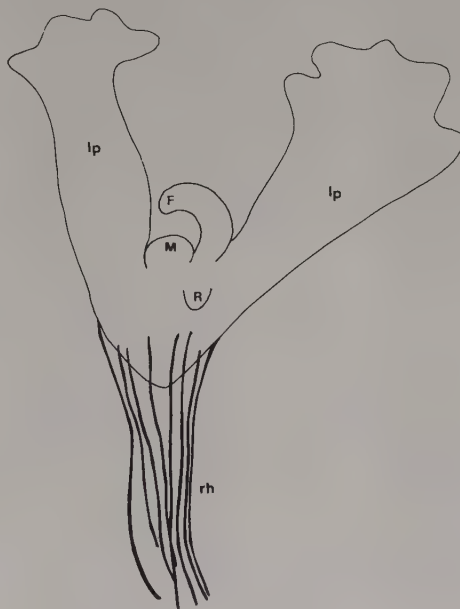


FIG. 18.

FIG. 17. — Schéma de la face ventrale d'un prothalle normal du *Pteris cretica* L. *c*, coussinet, épaissement indiquant l'emplacement des archégones et des anthéridies; *lp*, lame prothallienne; *rh*, rhizoïdes. (G. $\times$ 10.)

FIG. 18. — Schéma de la face ventrale d'une lame prothallienne (*lp*) du *Pteris cretica* L. sur laquelle se développe un sporophyte. *F*, première feuille du sporophyte; *R*, première racine du sporophyte; *M*, méristème apical du sporophyte; *rh*, rhizoïde. (G. $\times$ 10.)

meyers contenant le milieu nutritif. Les spores immergées donnent des éléments filamenteux sur lesquels la fécondation n'a généralement pas lieu. Si des sporophytes peuvent évoluer sur de tels prothalles, leur développement est alors très retardé. Les spores restées en surface, évoluent en des lames grossièrement cordiformes (fig. 17) constituées par une seule couche de cellules, lames qui demeurent à la surface du milieu nutritif. Au centre de ce prothalle, sur la face ventrale, un épaissement ou « coussinet »

(fig. 17, *c*) indique l'endroit où se forment les archégones et les anthéridies. Sous cet épaississement, de nombreux rhizoïdes (*rh*) permettent au gamétophyte de se fixer sur un support en assurant une partie de sa nutrition. La fécondation s'effectue rapidement. Un embryon construisant sa première feuille et sa première racine évolue en restant tout d'abord invisible à l'œil nu. Plusieurs embryons peuvent se former sur un même prothalle, mais ils ne sont pas au même stade de développement et, en général, un seul d'entre eux évolue en un sporophyte.

A un stade plus avancé (fig. 18), on peut distinguer au cœur du prothalle, sur la face ventrale, la première feuille (*F*) en cours d'élongation, recourbée en crosse, ainsi que la première racine (*R*) d'un sporophyte. Une petite masse rejetée sur le côté constitue le méristème apical (*M*). Dès ce stade, les feuilles de rang 2, 3 et 4 naissent régulièrement. A chaque feuille correspond une racine et la feuille et la racine de même rang naissent simultanément. A mesure que le sporophyte s'accroît, la lame prothallienne dégénère; le méristème apical, entouré par les jeunes feuilles qu'il forme, reste peu volumineux.

B. — Etude histocytologique de la mise en place du méristème.

La figure 19 et la planche XII, fig. a, présentent l'aspect, en section longitudinale, d'un embryon en cours de développement, encore inclus dans les tissus archégoniaux (*ta*). Cet embryon, à peu près sphérique, de 120 μ de diamètre, est constitué par des cellules isodiamétriques dont les noyaux et les nucléoles sont volumineux et très chromophiles, mais dont le cytoplasme est vacuolisé (Pl. XII, fig. a, *v*). A ce stade, sur les sections favorables, deux cellules sont reconnaissables par leur forme particulière : la cellule apicale de la première racine (fig. 19, *R*) et celle de la tige (fig. 19, *T*). La cellule apicale de la première feuille, située dans un autre plan a déjà commencé à fonctionner. Le jeune primordium (*P1*) est isolé du reste de l'embryon (voir Pl. XII, fig. a, *P1*). Peu après, la première racine devient visible également. A l'aisselle de la première feuille (*F1*) très vigoureuse qui s'accroît par le fonctionnement de son apicale et de ses voisines, un méristème s'individualise. Il est constitué par la cellule apicale qui, par ses recloisonnements, s'est entourée de ses dérivées (fig. 19, *flèches*), mais aussi vraisemblablement par quelques cellules provenant directement de l'embryon et qui ne sont pas issues de l'apicale. Seul, un « marquage » du cytoplasme et du noyau de la cellule apicale, dont le devenir pourrait ainsi être suivi dans les cellules du jeune apex formé au cours des divisions successives, permettrait d'affirmer que toutes les cellules du méristème proviennent bien ou non de cette apicale.

La planche XII, fig. b, présente l'aspect, en section longitudinale, d'un embryon à l'aisselle de la première feuille (*F1*) déjà recourbée et mesurant

80 μ de hauteur. On distingue un massif de 120 à 130 μ de diamètre à sa base et de 50 à 60 μ de hauteur constitué par un nombre restreint de cellules qui se recloisonnent activement de façon anticline et péricline (*flèches*). Les cellules de ce massif ont toutes un volumineux noyau très chromophile, avec un ou deux nucléoles vivement colorés par la pyronine. Leur cyto-

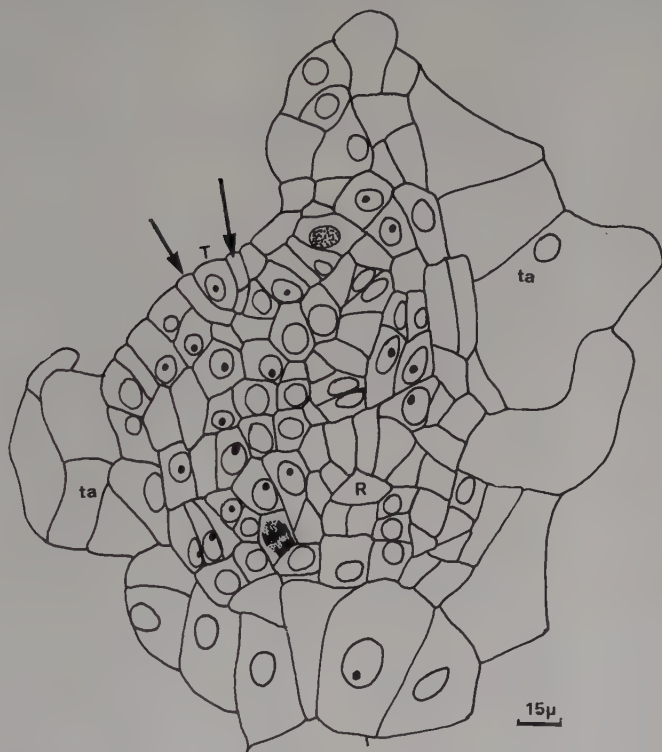


FIG. 19. — Schéma d'une section longitudinale d'un embryon encore inclus dans les tissus archégoniaux (*ta*). La cellule apicale de la première racine (*R*) et celle de l'axe (*T*) sont reconnaissables par leur forme. La section ne passe pas par la première feuille déjà individualisée.

plasme est pourvu d'une multitude de petites vacuoles disposées en étoile. La cellule apicale (*ca*) de 30 μ de hauteur sur 15 μ dans sa plus grande largeur n'est bien reconnaissable que par sa forme. Sous les trois à quatre couches de cellules superficielles (Pl. XII, fig. b, *ms*), on distingue quelques cellules en cours de différenciation dont le noyau aplati semble pycnotique, puis des trachéides (*tr*) précocement différenciées. Pendant que la première feuille et la première racine poursuivent leur croissance, le massif apical s'épaissit et s'organise en un dôme (Pl. XII, fig. c). A l'aisselle de F1 qui atteint 150 μ de hauteur, le méristème apical est constitué par un massif de

120 μ de diamètre et de 90 μ de hauteur dont les cellules ont l'aspect cyto-
logique décrit au stade précédent. La cellule apicale (Pl. XII, fig. c, *ca*),
désormais reconnaissable, non seulement par sa forme mais aussi par sa
taille, se divise fréquemment, tout comme les autres cellules. De part et
d'autre d'elle, une rangée de hautes cellules prismatiques (Pl. XII, fig. c,
da) la borde. Les cellules issues de recloisonnements périclines des déri-
vées de l'apicale se différencient plus profondément en trachéides (*tr*).

C. — Etude histocytologique du méristème au cours de la formation des feuilles de rang 2 et 3.

Alors que F1 atteint 250 μ de hauteur, le flanc du méristème, opposé
à son point d'attache, s'épaissit considérablement par une activité péricline
intense des cellules adjacentes à la cellule apicale (Pl. XII, fig. d). Celle-ci,
déjà reconnaissable par sa forme et par sa taille, devient remarquable par
son noyau volumineux et allongé qui perd de sa chromatocité, et par l'im-
portance de son appareil vacuolaire (Pl. XII, fig. d, *ca*).

Au niveau de la région méristématique, épaissie par une activité péri-
cline, une cellule superficielle s'accroît; son noyau, volumineux, reste très
chromophile (Pl. XIII, fig. a, *cs*). Cette cellule subit un cloisonnement oblique
qui isole l'apicale de la feuille de rang 2 de sa première dérivée. Les cellules
sous-jacentes s'organisent aussitôt en un faisceau procambial (*pc*).

Pendant que l'apicale de la feuille de rang 2 s'individualise, la cellule
apicale de la tige se recloisonne (Pl. XIII, fig. a, *ca*). L'apicale de l'axe,
comme toutes les autres cellules, participe donc, par son activité mitotique,

PLANCHE XII

FIG. a. — Section longitudinale d'un embryon encore inclus dans les tissus archégo-
niaux (*ta*). Le primordium de rang 1 (*P1*) est déjà individualisé. *v*, vacuoles.
Navachine - hématoxyline. (G. $\times$ 380.)

FIG. b. — Section longitudinale axiale d'un embryon. A l'aisselle de la première
feuille (*F1*), un méristème superficiel (*ms*), s'est constitué. Autour de l'apicale
(*ca*) reconnaissable seulement par sa forme, et dans la zone subapicale, les cel-
lules se divisent activement (*flèches*). Au-dessous de ce massif, les trachéides (*tr*)
se différencient progressivement. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle -
pyronine. (G. $\times$ 380.)

FIG. c et d. — Sections longitudinales de méristèmes en cours d'organisation dans les
jeunes plants issus de l'embryon.

c) A l'aisselle de F1, le méristème apical s'organise en un dôme. La cellule
apicale (*ca*) vient de se recloisonner; elle est bordée par ses dérivées (*da*).
Différenciation précoce de trachéides (*tr*). Navachine - hématoxyline. (G. $\times$ 380.)

d) Le flanc du méristème, opposé au point d'attache de F1, s'épaissit par des
cloisonnements périclines. La cellule apicale de l'axe (*ca*) devient remarquable
par son noyau volumineux mais peu chromophile et par ses vacuoles très déve-
loppées. *da*, dérivées de l'apicale. Navachine - hématoxyline. (G. $\times$ 380.)

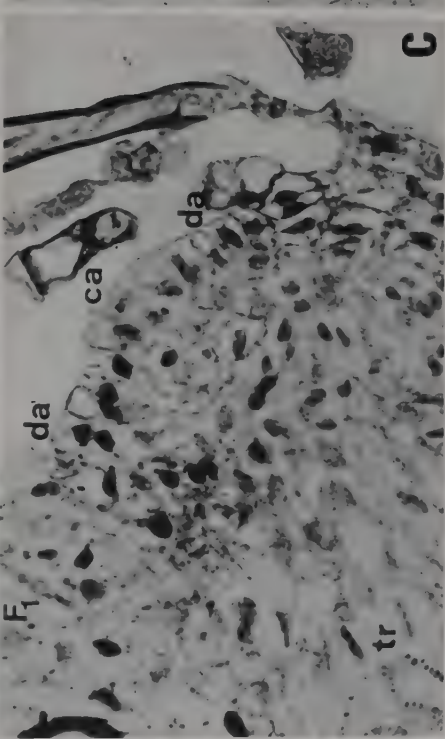
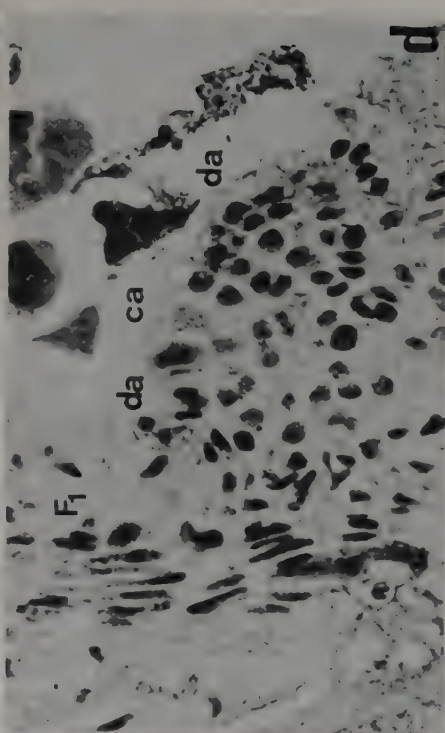
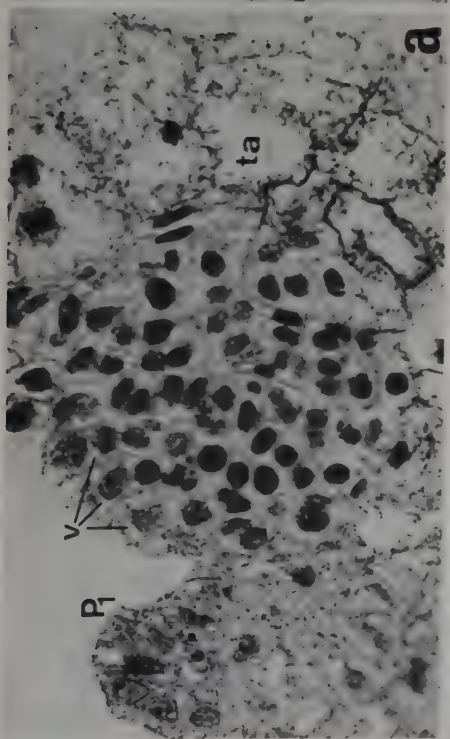
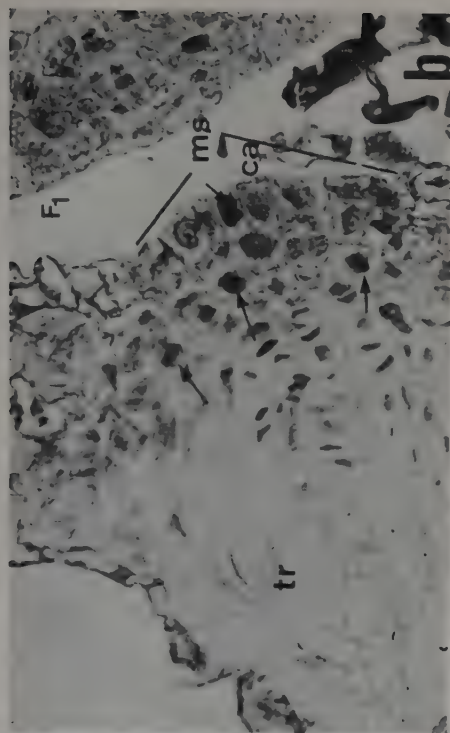


PLANCHE XII

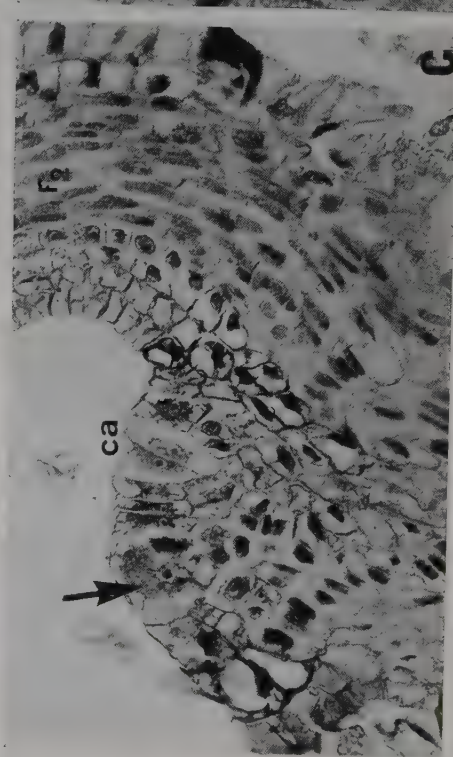
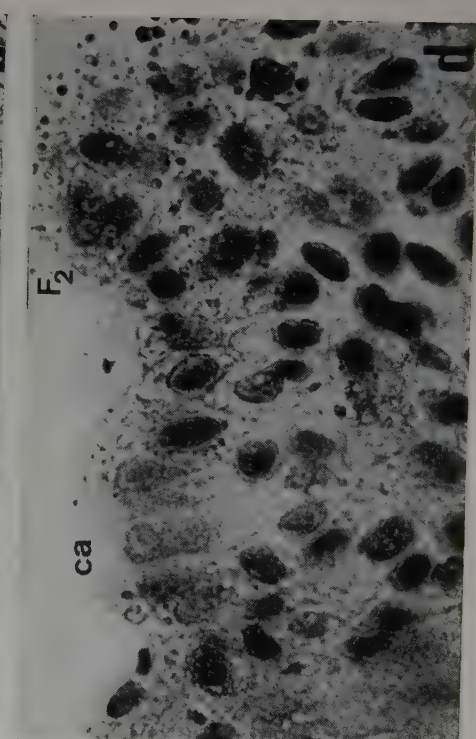
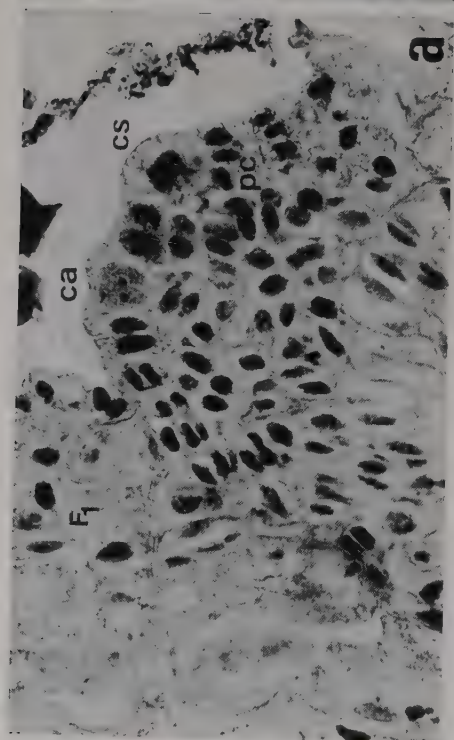
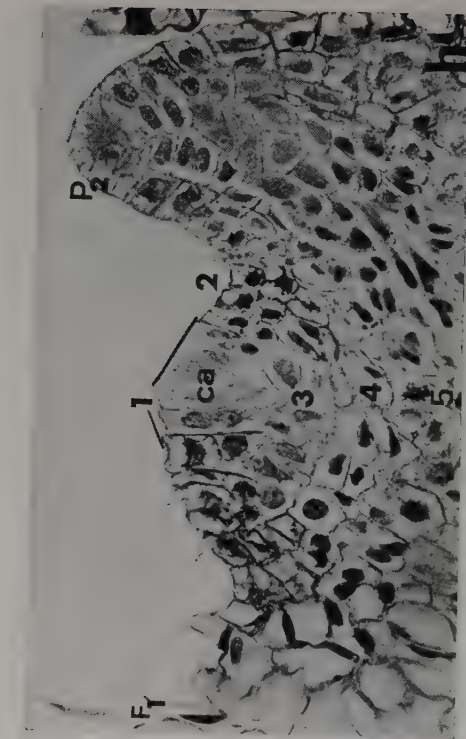


PLANCHE XIII

à la régénération du méristème qui, après l'initiation foliaire, se trouve réduit à 80 μ de diamètre à sa base. Le jeune primordium s'accroît par les mitoses répétées de l'apicale et de ses dérivées et il se détache du méristème (Pl. XIII, fig. b, P2).

Lorsque le primordium de rang 2 (P2) atteint 80 μ de hauteur, le diamètre du massif apical est à nouveau, à sa base, de 100 à 110 μ . La régénération du méristème s'est effectuée à partir des cellules situées à l'aisselle de P2, mais aussi grâce à l'activité mitotique de l'apicale et de ses voisines. A ce stade, cinq zones histologiques sont bien reconnaissables dans le méristème (Pl. XIII, fig. b) : la cellule apicale et ses dérivées les plus récentes forment la zone 1; de part et d'autre, de petites cellules cubiques, parmi lesquelles s'individualisent les apicales foliaires, constituent la zone 2. Le massif de cellules issues des recloisonnements péricleines des dérivées de l'apicale est appelé zone 3. La zone 4 ou méristème médullaire ne comporte qu'une ou deux assises cellulaires. Sous ces quatre zones, les cellules en cours de différenciation constituent la zone 5.

Ainsi, à l'aisselle de P2, dans le méristème apical régénéré qui n'a construit, en fait, qu'une seule feuille, les cinq zones histologiques sont déjà constituées.

Sur le flanc opposé au point d'attache de F2, qui mesure à ce stade 200 μ de hauteur, une cellule superficielle de la zone 2 augmente de volume. Elle se divise obliquement (Pl. XIII, fig. c, flèche) et met en place l'apicale de la feuille de rang 3 ainsi que sa première dérivée. Tandis que cette apicale s'individualise, la cellule apicale de l'axe (ca) se recloisonne à son tour (Pl. XIII, fig. c, ca). Le méristème, réduit à 80 μ de diamètre à sa base, se régénérera avant de construire la feuille de rang 4. A ce moment, la lame prothallienne est complètement dégénérée.

PLANCHE XIII

FIG. a, b, c et d. — Sections longitudinales axiales pratiquées au niveau du jeune méristème du *Pteris cretica* L.

a) Sur le flanc du méristème, opposé au point d'attache de F1, une cellule superficielle (cs) s'accroît. Une division oblique va isoler l'apicale de la feuille de rang 2 de sa première dérivée. Les cellules sous-jacentes s'organisent en un faisceau procambial (pc). La cellule apicale de l'axe (ca) vient de se recloisonner. Navachine - hématoxyline. (G. $\times$ 380.)

b) Dans le méristème apical, situé à l'aisselle de P2, cinq zones histologiques sont repérables (1 à 5). ca, cellule apicale de l'axe; F1, feuille de rang 1. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times$ 380.)

c) Sur le flanc opposé au point d'attache de la feuille de rang 2 (F2), la cellule apicale de la feuille de rang 3 (flèche) s'isole alors que la cellule apicale de l'axe (ca) se recloisonne. Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times$ 380.)

d) Mise en évidence de l'ADN par la réaction de FEULGEN dans un jeune méristème venant de former la feuille de rang 2 (F2). Les noyaux les moins chromophiles sont ceux de la cellule apicale et de ses voisines immédiates. (G. $\times$ 660.)

D. — Etude histochimique.

Différents tests histochimiques ont été appliqués à des méristèmes ayant construit la feuille de rang 2 ou de rang 3.

1° Mise en évidence de l'ADN.

Après la réaction de FEULGEN (Pl. XIII, fig. d), les noyaux des cellules de chacune des cinq zones histologiques sont bien colorés par le réactif de Schiff. Le noyau de la cellule apicale (*ca*) et celui des cellules voisines sont toutefois moins chromophiles que ceux des autres cellules. Cette différence dans l'affinité du réactif de Schiff s'accompagne de variations de forme et de taille nucléaires. Comme dans le méristème adulte, les noyaux des zones 2, 3 et 5 arrondis peuvent être assimilés à des sphères. Les noyaux allongés des zones 1 et 4 sont décomposés, afin de pouvoir calculer leur volume (voir fig. 7) en un cylindre central (dont la hauteur (*H*) et le diamètre (*Dc*) sont mesurés) et en deux demi-sphères a et b (dont le rayon (*R*) est déterminé) comme dans le méristème adulte. Le tableau XVI fournit, en μ , la moyenne de chacune de ces données numériques, ainsi que la valeur,

TABLEAU XVI. — DÉTERMINATION DES DIMENSIONS MOYENNES, EN μ , ET DES VOLUMES NUCLÉAIRES MOYENS, EN μ^3 , DANS LES DIVERSES ZONES APICALES DE CINQ JEUNES MÉRISTÈMES TRAITÉS PAR LA RÉACTION DE FEULGEN. Les mensurations portent sur les noyaux de cinq zones, examinés sur les sections où ils présentent leurs dimensions maximales. *D*, diamètre nucléaire; *H*, hauteur; *Dc*, diamètre du cylindre central des noyaux allongés des zones 1 et 4 (voir fig. 7); *R*, rayon de la demi-sphère a et b (voir fig. 7).

APEX N°	ZONE 1						ZONE 2	ZONE 3	ZONE 4			ZONE 5
	apicale			dérivées					ZONE 4			
	Dc	H	R	Dc	H	R			D	D	Dc	
1.	9,3	9,8	2,8	7	8,4	2,8	8,5	7	5,6	4,2	1,4	7
2.	7	7	2,8	6,3	5,6	1,4	6,3	7	5,6	4,2	1,4	7
3.	8,5	4,2	2,8	5,6	5,6	1,4	5,6	6,3	4,2	2,8	2,1	5,6
4.	7	5,6	1,4	5,6	4,2	1,4	7	7	5,6	4,2	1,4	6,3
5.	9,3	5,6	2,8	6,3	5,6	1,4	8,5	7	5,6	4,2	2,8	7
Valeurs moyennes en μ .	8,22	6,44	2,52	6,16	5,88	1,68	7,18	6,86	5,32	3,92	1,82	6,58
Volumes moyens en μ^3 .	341,51 + 67,02 408,5			174,98 + 19,85 194,83 $\simeq$ 195			193,77 $\simeq$ 194	169	86,98 + 25,25 112,23 $\simeq$ 112			149,16 149

en μ^3 , des volumes nucléaires estimés au niveau des cinq zones apicales, à partir de cinq méristèmes traités par la réaction de FEULGEN.

Dans le méristème jeune, comme chez l'adulte, ce sont donc les noyaux les plus volumineux qui sont les moins chromophiles.

2° Mise en évidence de l'ARN.

La planche XIV, fig. a, présente un jeune méristème coloré par le vert de méthyle-pyronine. La cellule apicale (*ca*) et sa dernière dérivée (*flèche*) sont très vacuolisées, les travées cytoplasmiques sont peu colorées par la pyronine. Les cellules des autres zones sont moins vacuolisées que celles de la zone 1 et leur cytoplasme est plus pyroninophile. Une légère zonation peut donc être mise en évidence montrant que les cellules de la zone 1 sont moins riches en ARN que les autres cellules apicales. Les nucléoles sont tous vivement pyroninophiles.

Le tableau XVII présente les diamètres nucléolaires moyens estimés

TABLEAU XVII. — DÉTERMINATION DES DIAMÈTRES NUCLÉOLAIRES MOYENS, EN μ , ET DES VOLUMES NUCLÉOLAIRES MOYENS, EN μ^3 , DANS LES DIVERSES ZONES APICALES À PARTIR DE CINQ JEUNES MÉRISTÈMES COLORÉS PAR LE VERT DE MÉTHYLE-PYRONINE.

APEX N°	ZONE 1		ZONE 2	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	apicale	dérivées				
	D	D				
1.	2,1	1,4	1,4	2,1	1,4	1,4
2.	2,8	2,8	2,1	2,1	1,4	1,4
3.	2,8	2,1	1,4	1,4	1,4	1,4
4.	2,8	2,1	1,4	2,1	1,4	2,1
5.	2,1	2,8	1,4	2,8	2,1	1,4
Valeurs moyennes en μ .	2,52	2,24	1,54	2,10	1,54	1,54
Volumes moyens en μ^3 .	8,37 $\simeq$ 8,4	5,88 $\simeq$ 5,9	1,9	4,8	1,9	1,9

au niveau des diverses zones de cinq jeunes méristèmes colorés par le vert de méthyle-pyronine.

Les variations du diamètre nucléolaire dans les diverses zones apicales sont parallèles aux variations des dimensions nucléaires. Comme pour le méristème adulte, ce sont encore les noyaux les plus volumineux de la zone 1 qui renferment les plus gros nucléoles.

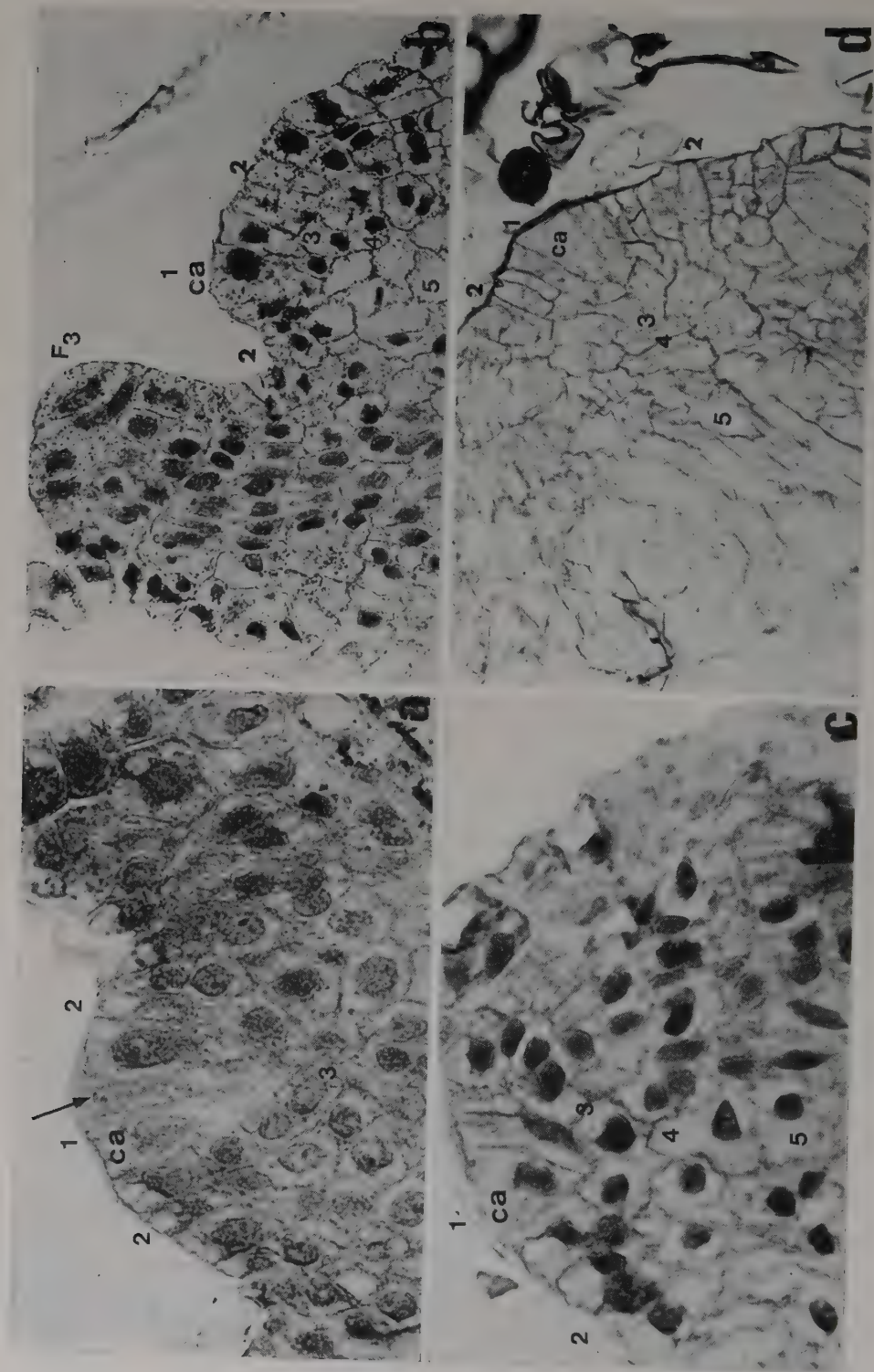


PLANCHE XIV

3° Recherche de la protéine totale.

Après la réaction de MAZIA, BREWERT et ALFERT, les travées cytoplasmiques des cellules du méristème se colorent en bleu très pâle (Pl. XIV, fig. b). Le cytoplasme du méristème est donc assez pauvre en protéine totale. Les noyaux sont, par contre, tous très vivement colorés mais aucune répartition par zones de cette coloration n'est décelable. La teneur en protéine totale semble donc identique pour toutes les cellules.

4° Recherche des protéines à groupements —SH.

Après application de la méthode de BARNETT et SELIGMAN (Pl. XIV, fig. c), les travées cytoplasmiques sont uniformément colorées en rose, ce qui prouve que les protéines à groupements —SH sont éparses dans les cellules. Les noyaux et les nucléoles sont tous très chromophiles mais restent toujours colorés en rose. Aucune zonation n'est décelable. La teneur en protéine —SH est donc sensiblement identique pour toutes les cellules du méristème.

5° Mise en évidence des composés phénoliques.

La figure 20 présente une section longitudinale axiale d'un méristème fixé par le mélange de REGAUD et coloré par l'hématoxyline de REGAUD. Les vacuoles tannifères (*vt*) sont petites, assez peu nombreuses et réparties uni-

PLANCHE XIV

FIG. a, b, c et d. — Etudes histochimiques effectuées sur des sections longitudinales axiales du jeune méristème du *Pteris cretica* L. ayant formé la feuille de rang 3 (*F3*). *ca*, cellule apicale; 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones méristématiques.

a) Mise en évidence de l'ARN. Le cytoplasme fortement vacuolisé de la cellule apicale et de sa dernière dérivée (*flèche*) est très peu pyroninophile. Les cellules de la zone 2 sont plus colorées. Ethanol-formol-acide acétique-vert de méthyle-pyronine. (G. $\times$ 660.)

b) Mise en évidence de la protéine totale. Les travées cytoplasmiques sont très faiblement colorées, les noyaux, par contre, sont tous très chromophiles. Aucune zonation n'est décelable. Ethanol-formol-acide acétique-bleu de bromophénol. (G. $\times$ 380.)

c) Mise en évidence des protéines à groupements —SH par la méthode de BARNETT et SELIGMAN. Les travées cytoplasmiques sont colorées en rose, ce qui indique leur faible teneur en protéines à groupement —SH. Les noyaux sont tous très chromophiles. Aucune zonation n'est décelable. (G. $\times$ 660.)

d) Réaction P.A.S. mettant en évidence l'absence de grain d'amidon dans les cellules du jeune méristème. Ethanol-formol-acide acétique-acide periodique-Schiff.

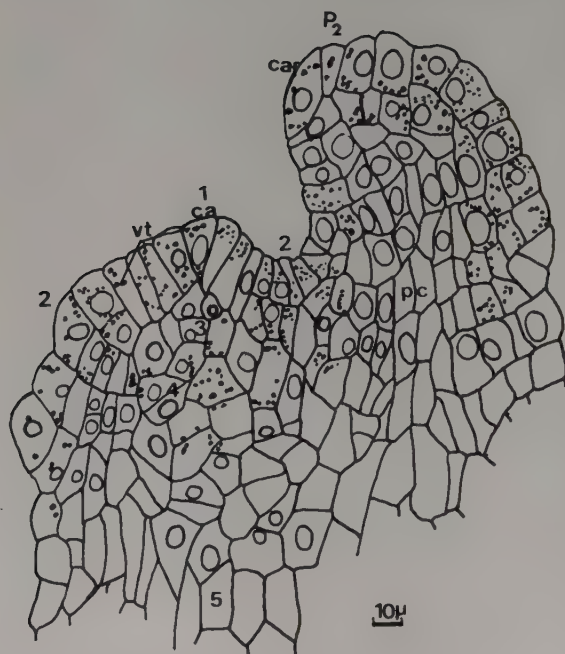


FIG. 20.

Schéma d'une section longitudinale axiale du méristème d'un jeune sporophyte ayant construit la feuille de rang 2 (P_2). Les vacuoles tannifères (*vt*) sont réparties à peu près uniformément dans les cellules des assises superficielles du méristème et du primordium. *ca*, cellule apicale; *caf*, cellule apicale foliaire; *pc*, faisceau procambial; 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones apicales.

formément dans la première assise cellulaire. Le nombre de ces vacuoles diminue dans les cellules des zones 3 et 4. Au niveau du primordium de rang 2 (P_2), elles ne sont présentes que dans les assises superficielles. Les cellules du faisceau procambial (*pc*) en sont totalement dépourvues.

6° Recherche de l'amidon et des lipides.

Cette recherche a été effectuée sur les jeunes méristèmes au moyen des mêmes méthodes que pour les plantes adultes. Les résultats ont tous été négatifs. Les cellules des jeunes méristèmes semblent donc dépourvues de globules lipidiques et de plastes amylières (Pl. XIV, fig. d).

Ainsi, dans le jeune méristème qui a construit la feuille de rang 2, les cellules de la zone 1 sont moins riches en ARN que celles de la zone 2. La cellule apicale et ses voisins possèdent des nucléoles volumineux et bien pyroninophiles, tandis que leurs noyaux, de volume important, sont peu chromophiles. Ce méristème, dans son ensemble, est peu riche en protéine totale et en protéines à groupements —SH, mais aucune répartition par zone ne peut être décelée.

E. — Etude cytologique en microscopie photonique et électronique.

Les figures a, b, c et d de la planche XIII montrent l'importance relative du noyau, des vacuoles et du cytoplasme dans les cellules des diverses zones apicales. Le tableau XVIII présente l'épaisseur (*E*) (estimée sur des sections transversales), la largeur (*L*) et la hauteur (*H*) moyennes (estimées sur des sections longitudinales) des cellules des zones 1 et 2. L'apicale étant assimilée à une pyramide, ses voisines et les cellules de la zone 2 à des parallélépipèdes, le volume de ces cellules en μ^3 peut être calculé (voir tableau XVIII).

Le rapport nucléoplasmique des cellules des zones 1 et 2 est établi en se référant aux volumes nucléaires présentés par le tableau XVI. Ainsi, le RNP de la cellule apicale est de : $\frac{408}{3\,207 - 408}$, soit $\simeq \frac{1}{6}$; celui de ses dérivées de : $\frac{195}{1\,058 - 195}$, soit $\simeq \frac{1}{4}$; et, enfin, celui des cellules de la zone 2 est de : $\frac{194}{668 - 194}$, soit $\simeq \frac{1}{2,5}$.

TABLEAU XVIII. — DÉTERMINATION DE L'ÉPAISSEUR *E*, DE LA LARGEUR *L* ET DE LA HAUTEUR *H*, MOYENNES, EN μ , DES CELLULES DES ZONES 1 ET 2. Mesures effectuées sur cinq jeunes méristèmes. L'épaisseur est évaluée sur des sections transversales; la hauteur et la largeur, sur des sections longitudinales. L'apicale étant assimilée à une pyramide, les autres cellules à des parallélépipèdes, le volume moyen de ces cellules peut être calculé en μ^3 .

APEX N°	ZONE 1						ZONE 2		
	apicale			dérivées					
	E	L	H	E	L	H	E	L	H
1.	18,3	16,9	28,2	8,4	9,8	14,1	7	7	9,8
2.	19,7	21,1	26,8	7	8,5	12,7	7	8,4	9,8
3.	16,9	18,3	28,2	9,8	11,2	14,1	8,4	8,4	9,8
4.	18,3	19,7	31	8,4	7	12,7	9,8	11,3	11,2
5.	18,3	18,3	29,6	9,8	8,5	14,1	7	8,4	8,4
Valeurs moyennes en μ .	18,10	18,86	28,18	8,68	9	13,54	7,84	8,70	9,80
Volumes moyens en μ^3 .	3 206,56 $\simeq$ 3 207			1 057,74 $\simeq$ 1 058			668,43 $\simeq$ 668		

Les cellules de la zone 1 sont très vacuolisées et leurs vacuoles sont encombrées de résidus membranaires divers (voir Pl. XV, *v*, *flèches*). Le noyau, oblong et volumineux, est peu chromatique (Pl. XV, *N*). Le cyto-

plasme est réduit à un film périnucléaire, relié à la couche pariétale par de fines travées (Pl. XV, *tc*). Sa densité est assez faible (Pl. XV et Pl. XVI, fig. a). Les mitochondries (Pl. XV et Pl. XVI, fig. a, *mi*), sphériques, sont très pauvres en crêtes et leur stroma reste clair. Les dictyosomes, très peu nombreux (Pl. XVI, fig. b, *d*), ne sont constitués que par trois à quatre saccules et leur activité est peu importante. Le réticulum endoplasmique (Pl. XV et Pl. XVI, fig. c, *re*), peu développé, est essentiellement présent sous forme lisse. Les plastes, très nombreux et en navette, peuvent renfermer un grain d'amidon (Pl. XVI, fig. c, *a*) mais, le plus souvent, ils possèdent des globules lipidiques (*l*) et des inclusions sombres, (*is*), analogues à celles décelées dans les plastes des cellules du méristème adulte (voir Pl. VI et Pl. VII). Ces cellules possèdent de fines membranes et un grand nombre de plasmodesmes (Pl. XV et Pl. XVI, fig. c, *pd*) qui les relient entre elles.

Les cellules de la zone 2, qui ont un rapport nucléoplasmique plus élevé que celui des cellules de la zone 1, sont aussi beaucoup moins vacuolisées (Pl. XVII). Le cytoplasme, dense, dans lequel on peut discerner des ribosomes groupés en polysomes (Pl. XVII, *flèche*) renferme de nombreuses petites mitochondries sphériques (Pl. XVII et Pl. XVIII, fig. a, *mi*) très peu structurées. Le réticulum endoplasmique (Pl. XVII et Pl. XVIII, fig. a, *re*) peu important est parfois sous forme granulifère. Quelques dictyosomes sont observables (Pl. XVIII, fig. b, *d*). Les plastes nombreux (Pl. XVII et Pl. XVIII, fig. a, *p*) ont la même structure que ceux de la zone 1.

Les cellules de la zone 1 sont plus vacuolisées que celles de la zone 2, mais elles sont aussi plus volumineuses. Il nous a donc paru intéressant de déterminer les pourcentages de cytoplasme actif ou libre pour les cellules de chacune de ces deux zones afin de pouvoir les comparer.

La technique utilisée pour le méristème adulte a été appliquée sur une photographie de la cellule apicale, prise au microscope électronique à un faible grandissement. La surface cellulaire totale est planimétrée, soit 335 μ^2 . Les surfaces du noyau, des vacuoles et des plastes sont estimées

PLANCHES XV, XVI, XVII, XVIII et XIX

Aspects, en microscopie électronique, des cellules des zones apicales 1, 2 et 4.
Fixateur : glutaraldéhyde postosmié. Contrastant : KMnO_4 .

PLANCHE XV

Aspect de l'apicale A venant d'émettre une dérivée. Le cytoplasme peu dense est réduit au film périnucléaire, relié à la couche pariétale par des trabécules cytoplasmiques (*tc*). Les mitochondries (*mi*) sphériques sont très peu structurées. Le réticulum endoplasmique (*re*) peu abondant est le plus souvent sous forme lisse. Les membranes fines présentent de nombreux plasmodesmes (*pd*). *N*, noyau; *v*, vacuoles souvent encombrées de structures membranaires diverses (*flèches*). (G. $\times 20\,900$.)

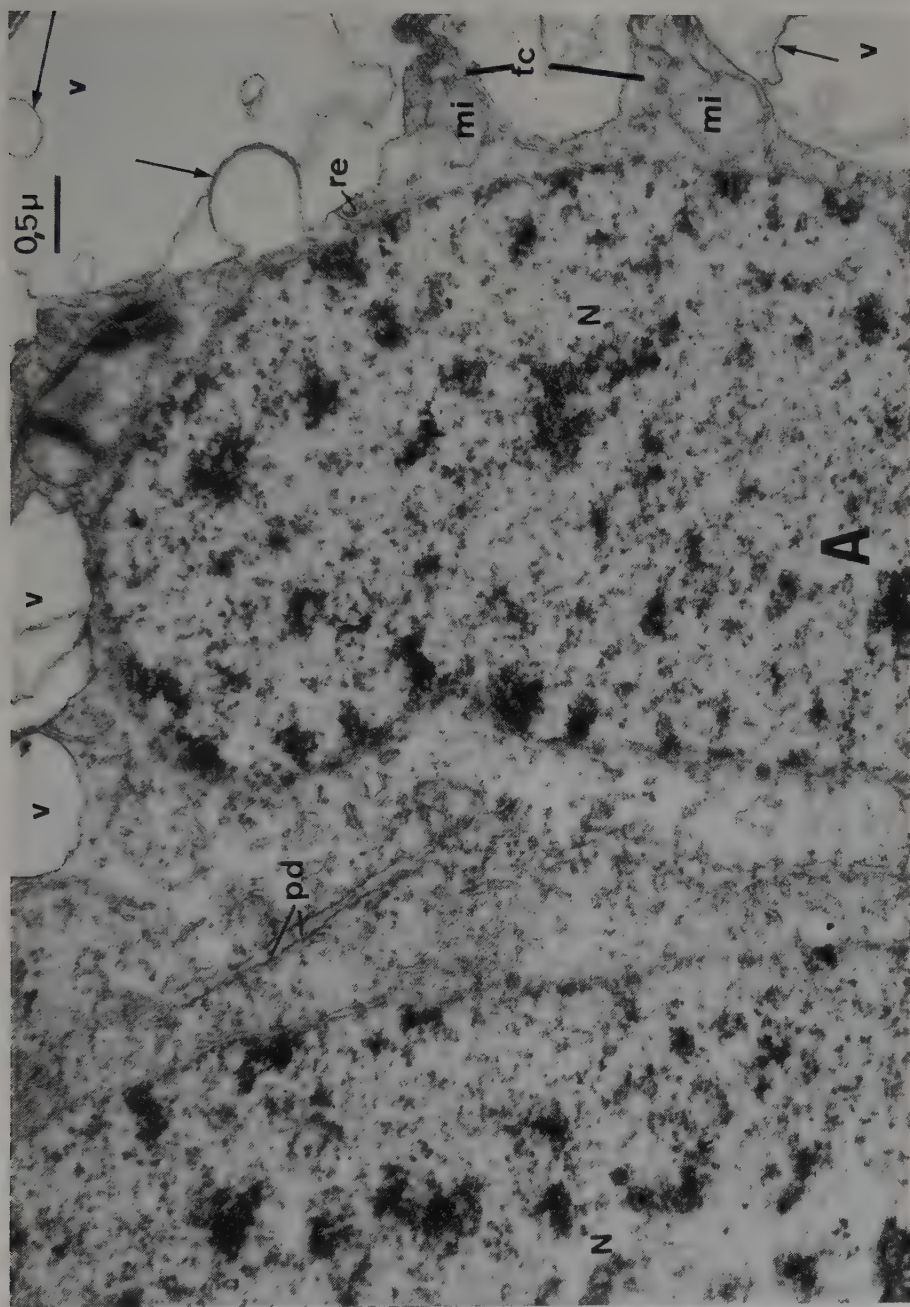


PLANCHE XV

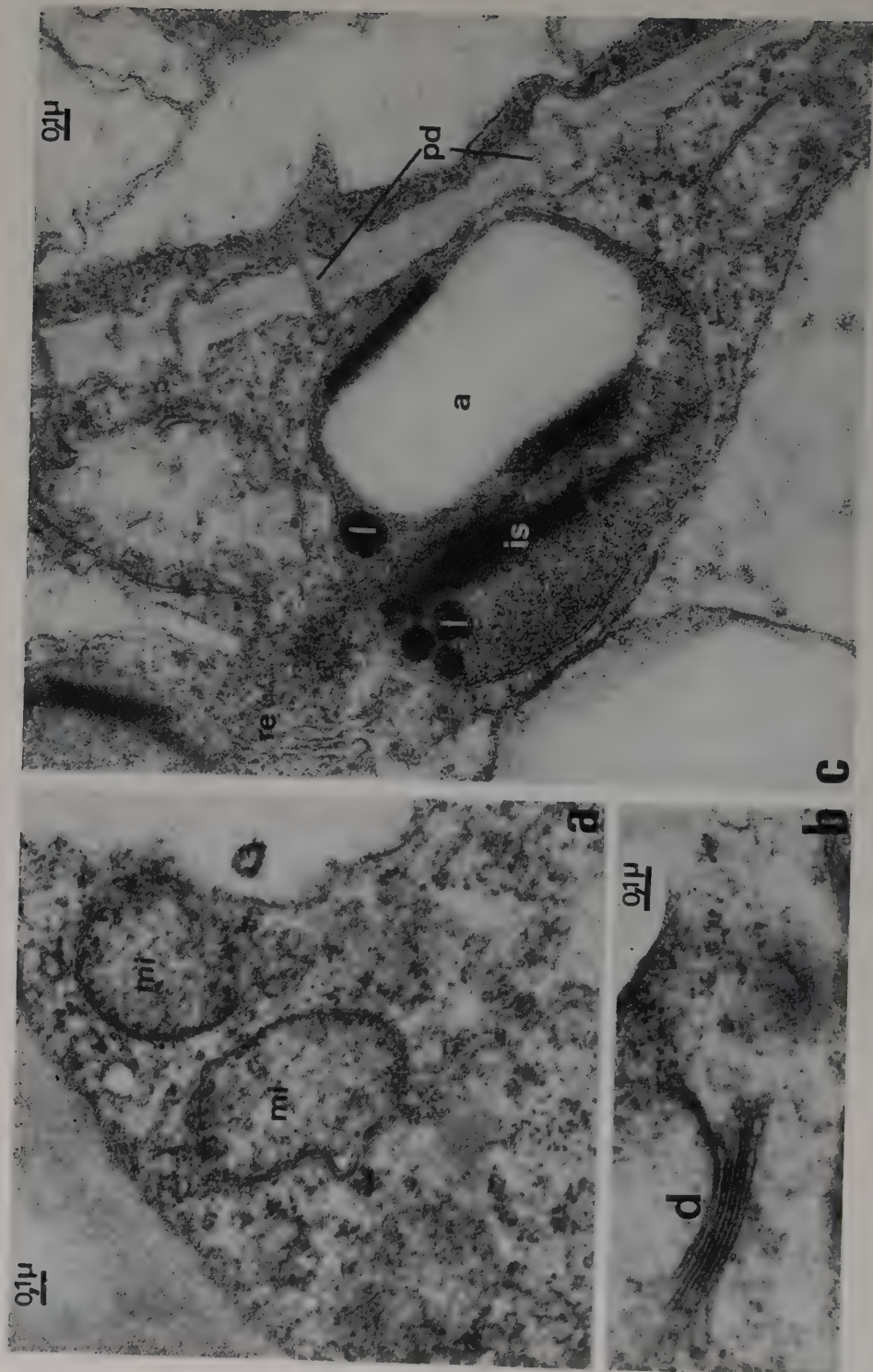


PLANCHE XVI

respectivement à $50 \mu^2$, $201 \mu^2$ et $3 \mu^2$. La surface du cytoplasme libre est donc $335 - 254 = 81 \mu^2$. Dans la cellule apicale d'un jeune méristème, le cytoplasme libre représente 24 % de la surface totale.

Les mêmes mesures et les mêmes calculs ont été réalisés pour une cellule de la zone 2. La surface totale de la cellule mesurée est de $166 \mu^2$, les surfaces du noyau, des vacuoles et des plastes sont respectivement de $56 \mu^2$, $43 \mu^2$ et $6 \mu^2$. La surface du cytoplasme libre est donc de $166 - (56 + 43 + 6) = 61 \mu^2$. Dans une cellule latérale d'un jeune méristème, le cytoplasme libre représente 36,7 % de la surface totale. Ces résultats montrent que les cellules de la zone 2 sont plus riches en cytoplasme que celles de la zone 1 qui sont pourtant plus volumineuses qu'elles.

Les cellules de la zone 3 présentent les mêmes caractéristiques ultra-structurales que celles de la zone 2.

Les cellules de la zone 4, moins vacuolisées (Pl. XIX) que celles de la zone 1, possèdent un hyaloplasme moins dense que les cellules de la zone 2 (comparer Pl. XVIII, fig. a et Pl. XIX, fig. a). Les mitochondries (Pl. XIX, fig. a, *mi*) sphériques sont encore peu structurées et à stroma clair. Le réticulum endoplasmique (Pl. XIX, fig. a et b, *re*), plus développé que dans les cellules des autres zones, est sous forme « lisse » ou « granulifère ». Les dictyosomes, peu nombreux (Pl. XIX, fig. b, *d*), ne comportent qu'un nombre restreint de saccules très allongés. Les plastes en navette (Pl. XIX, fig. a) possèdent, comme précédemment, de petits grains d'amidon (*a*) et des globules lipidiques (*l*). Des grana (*g*), se sont différenciés, tandis que les inclusions denses (*is*), si abondantes dans les plastes plus jeunes des zones 1 et 2, sont désormais peu nombreuses. Ces faits tendent à vérifier l'hypothèse de SRIVASTAVA [59] selon laquelle les inclusions denses seraient des protéines susceptibles de servir à la construction des thylakoïdes.

Ainsi, dans le jeune méristème, la zone 1 est remarquable par son cytoplasme très vacuolisé et de faible densité. Les zones 2 et 3, par contre, présentent des caractères comparables à ceux des cellules méristématiques primaires typiques, alors que dans la zone 4, les cellules allongées, au réticulum endoplasmique plus abondant, possèdent à nouveau des caractères voisins de ceux décrits pour les cellules cambiales.

PLANCHE XVI

Fig. a, b et c. — Détails de l'ultrastructure de la cellule apicale.

- a) Aspect du cytoplasme d'assez faible densité de la cellule apicale. Les mitochondries (*mi*) sphériques n'ont que de rares crêtes, leur stroma est clair. (G. $\times 46\ 200$.)
- b) Les dictyosomes (*d*) de la cellule apicale sont rares et peu actifs; ils ne comportent que 3 à 4 saccules. (G. $\times 59\ 400$.)
- c) Les plastes de la cellule apicale renferment de petits grains d'amidon (*a*), des globules lipidiques (*l*) et des inclusions denses (*is*). *pd*, plasmodesmes. (G. $\times 50\ 600$.)

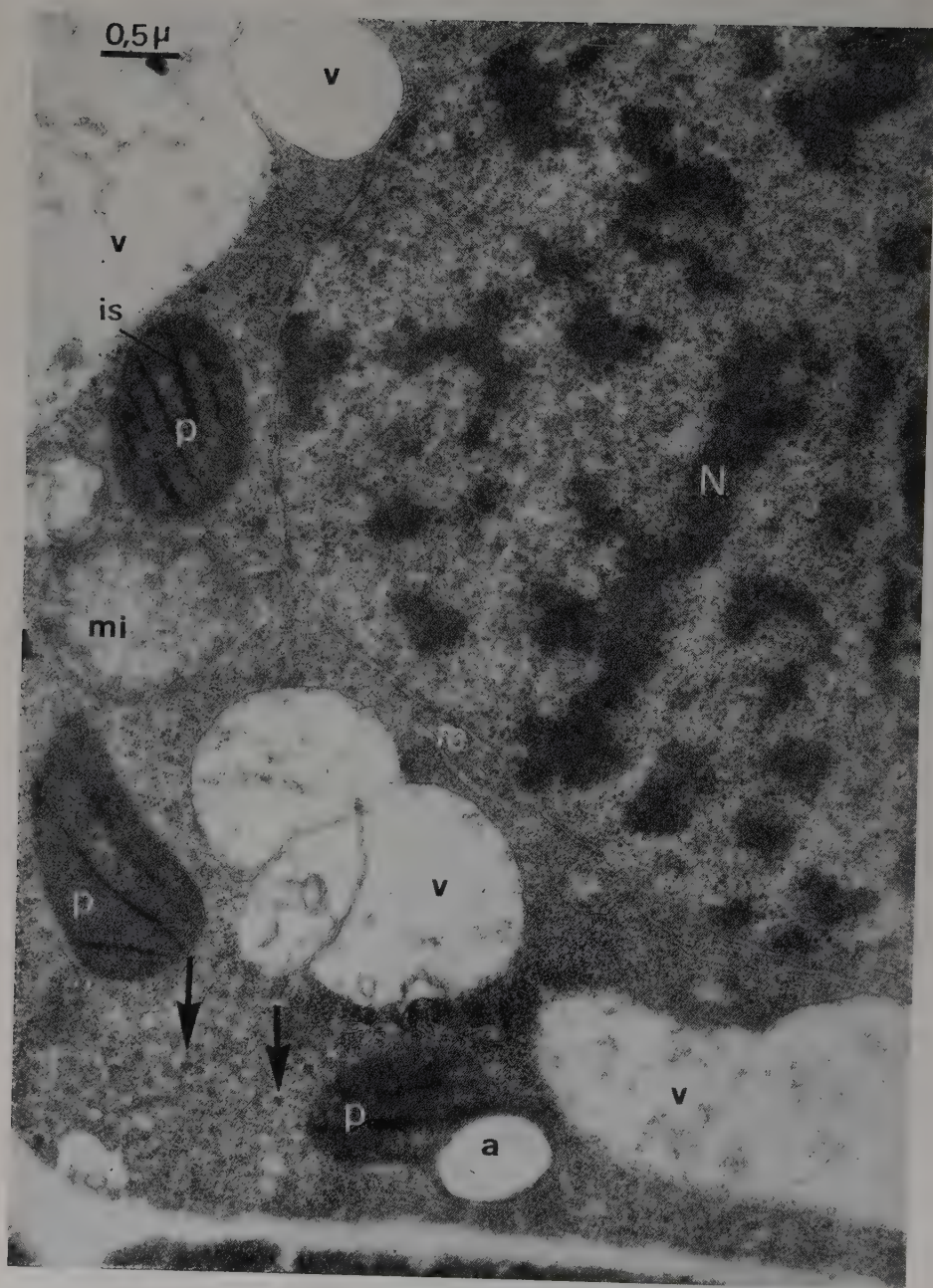


PLANCHE XVII

Portion d'une cellule de la zone 2. Le cytoplasme, dense, présente de nombreux ribosomes groupés en polysomes (*flèches*), les mitochondries (*mi*) sont sphériques, le réticulum endoplasmique (*re*) est lisse ou granulifère, les plastes (*p*) renferment des inclusions sombres (*is*), parfois un petit grain d'amidon (*a*). Noter le noyau volumineux (*N*) et les vacuoles nombreuses mais petites (*v*). (G. $\times 20\,900$.)

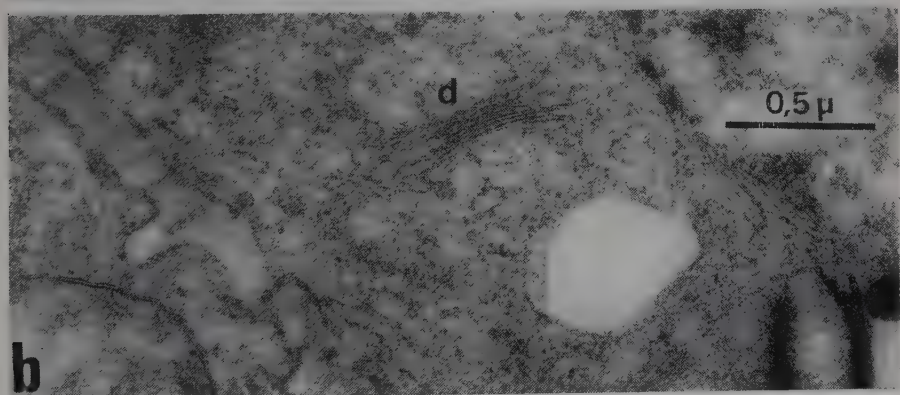
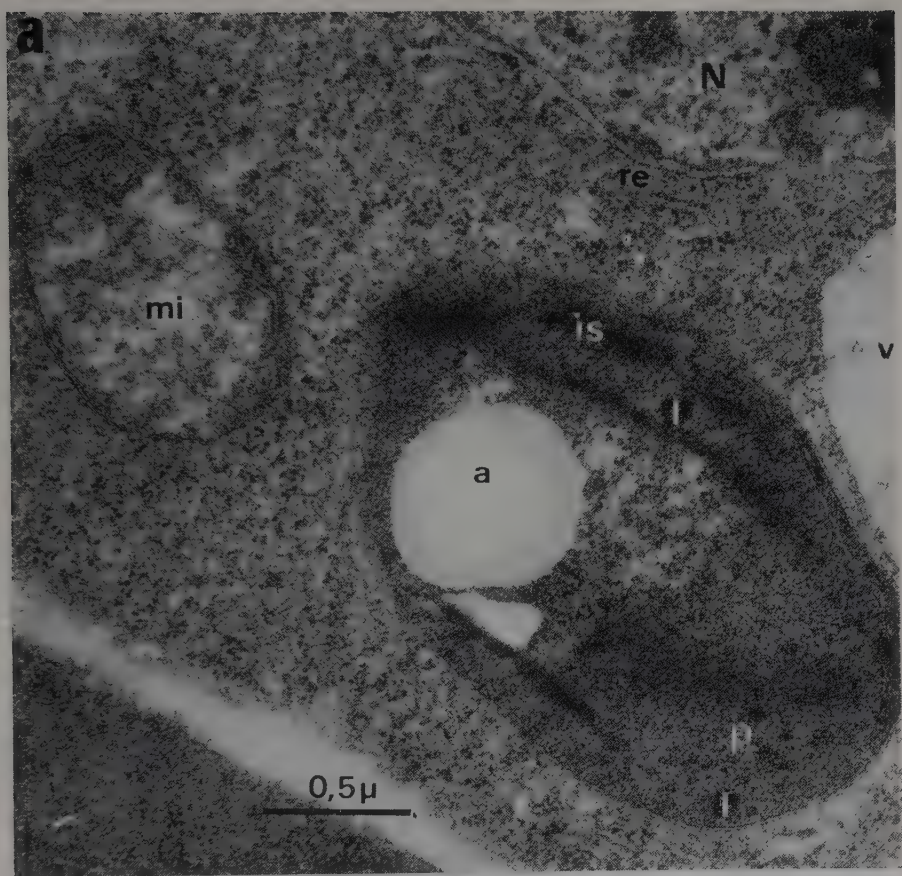


PLANCHE XVIII

FIG. a et b. — Détails de l'ultrastructure des cellules de la zone 2.
(G. $\times$ 39 600.)

- a) Les mitochondries (*mi*) sphériques sont pauvres en crêtes. Le réticulum endoplasmique (*re*) est lisse ou granuleux. Les plastides (*p*) dans lesquels se différencient des inclusions sombres (*is*) renferment quelques globules lipidiques (*l*) et de petits grains d'amidon (*a*). *N*, noyau; *v*, vacuole.
- b) Les dictyosomes (*d*), actifs, ne sont constitués que par quelques saccules.

F. — Résultats histautoradiographiques.

Afin d'établir le comportement des diverses zones apicales, des incorporations de thymidine et d'uridine tritiées ont été effectuées sur de jeunes méristèmes venant de construire leur deuxième feuille.

1° Incorporation de thymidine tritiée.

Les pourcentages de noyaux marqués dans les cinq zones apicales après une incorporation de 4 heures sont présentés par le tableau XIX.

TABLEAU XIX. — POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS DANS LES CINQ ZONES APICALES, DÉTERMINÉS SUR TRENTE JEUNES MÉRISTÈMES, APRÈS INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIÉE DURANT 4 HEURES.

	ZONE 1		ZONE 2 à l'aisselle de n	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	apicale	dérivées				
Nombre de noyaux marqués.	3	13	16	24	24	36
Nombre de noyaux non marqués.	27	92	96	148	188	284
Nombre total de noyaux.	30	105	112	172	212	320
Pourcentage de noyaux marqués.	10	12,38	14,28	13,95	11,32	11,25

PLANCHE XIX

FIG. a et b. — Aires cytoplasmiques de cellules de la zone 4. Le hyaloplasme, moins dense que celui de la zone 2, renferme un réticulum endoplasmique (*re*) plus abondant, sous forme lisse ou granulifère.

a) Les mitochondries (*mi*), sont sphériques, à stroma clair et peu structurées; dans les plastes allongés, des grana (*g*) se sont organisés. *a*, amidon; *l*, gouttelette lipidique. (G. $\times$ 33 000.)

b) Aspect d'un dictyosome (*d*) aux saccules très allongés et peu nombreux. (G. $\times$ 59 400.)

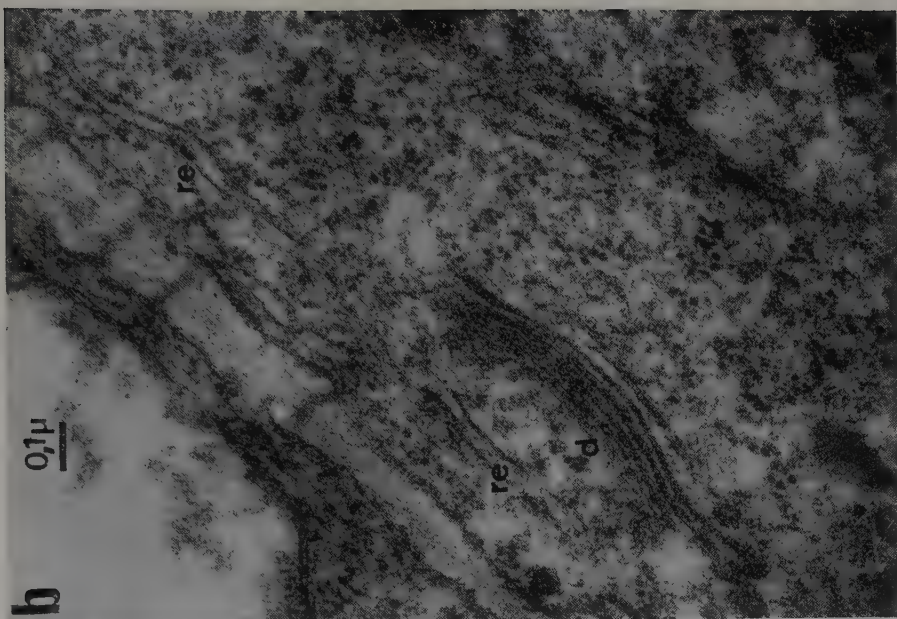
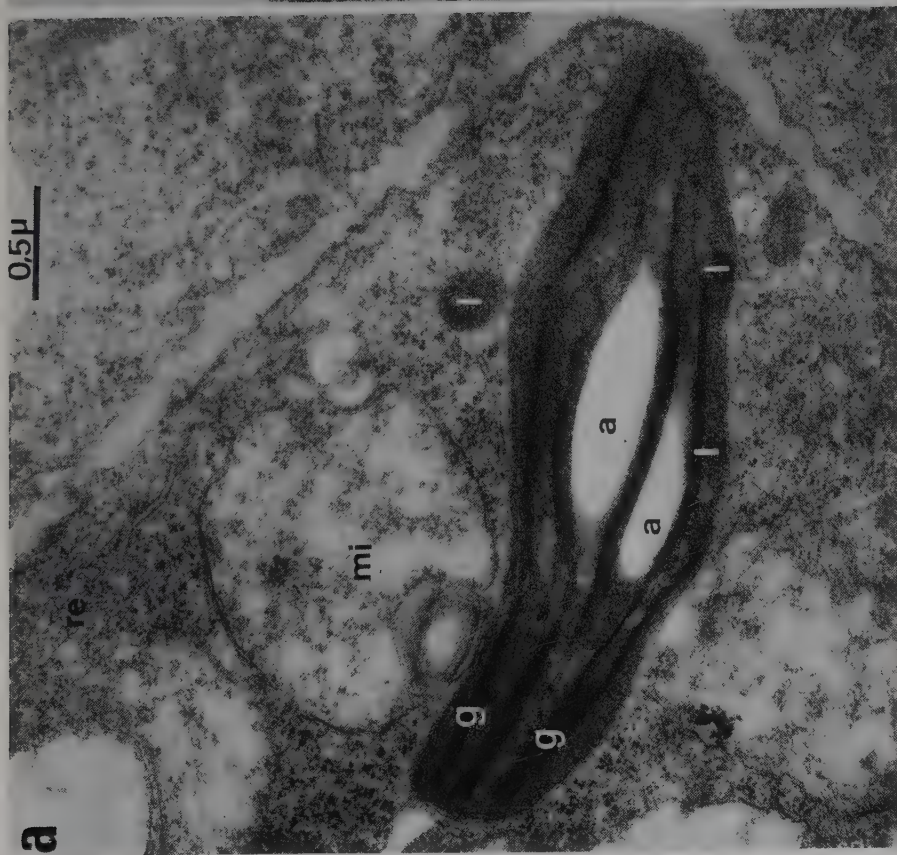


PLANCHE XIX

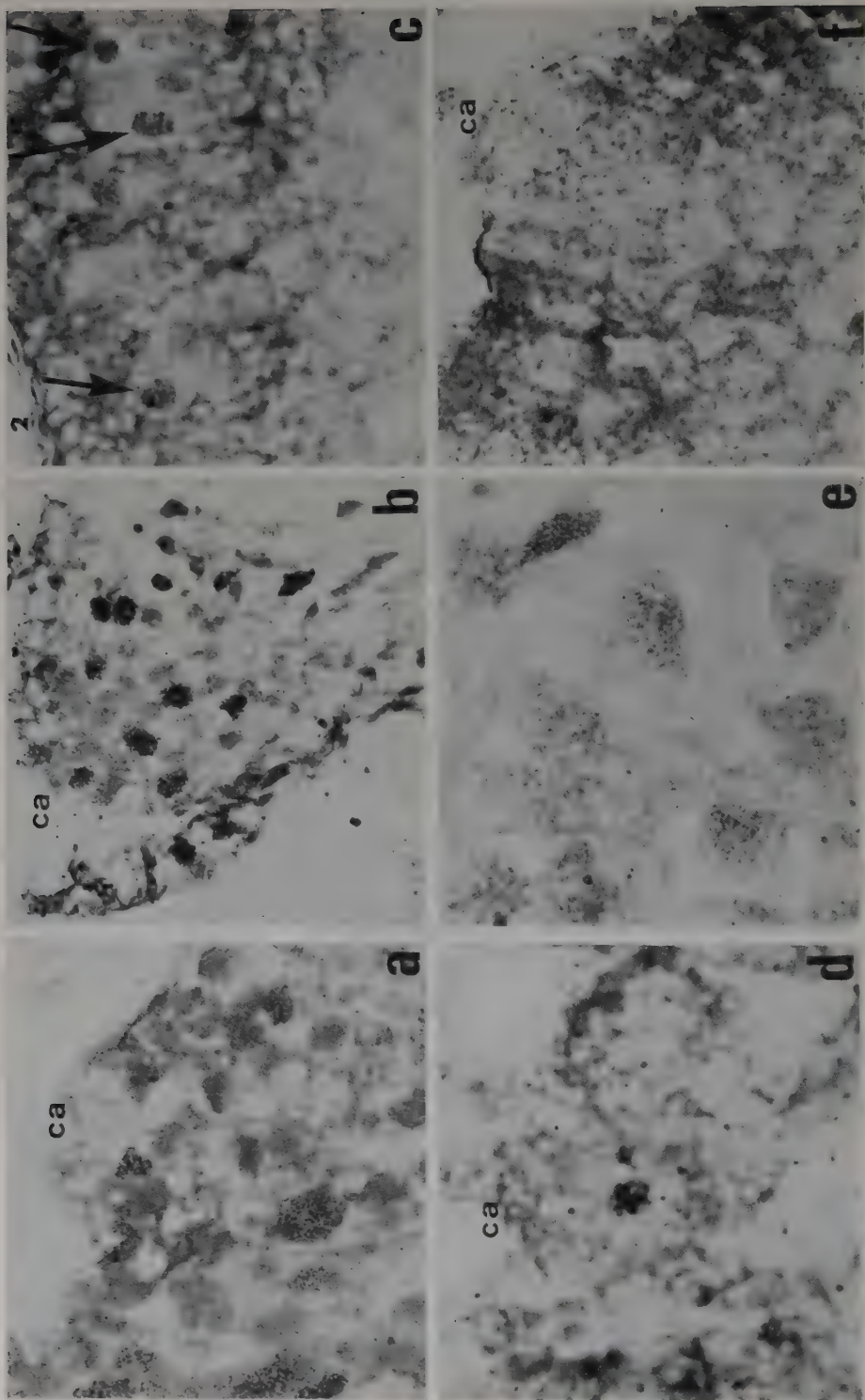


PLANCHE XX

Les résultats obtenus montrent que ce sont les cellules de la zone 2, situées à l'aisselle du dernier primordium formé (n), qui incorporent le plus le précurseur radioactif. Cependant, les pourcentages obtenus pour les autres zones apicales sont très voisins. Afin de voir si les différences qui existent entre les pourcentages de noyaux marqués des zones 1 et 2, et 1 et 3, sont statistiquement valables, la méthode du χ_2 a été employée (tableaux XX et XXI).

Le pourcentage de noyaux marqués dans les cellules apicales a été établi sur trente échantillons, donc sur trente cellules seulement; de ce fait, l'erreur absolue est très grande et les pourcentages obtenus sur l'*apicale seule* ne peuvent pas être utilement comparés à ceux des autres zones. Aussi, pour la zone 1, avons-nous utilisé des pourcentages calculés sur la moyenne des pourcentages obtenus sur la cellule apicale et sur ses dérivées.

Les valeurs du χ_2 inférieures à 3,84 prouvent que les différences ne sont pas significatives entre les zones 1 et 2 ou 1 et 3. Ainsi les cellules des zones 1 et 2 et des zones 1 et 3 ont des comportements tout à fait comparables quant à leur aptitude à incorporer la thymidine tritiée (Pl. XX, fig. a). *Dans le jeune méristème, les synthèses d'ADN, assez fréquentes, sont donc uniformément réparties.*

Afin de préciser si ces synthèses sont bien les prémices de futures divisions cellulaires, la valeur des index mitotiques a été déterminée pour chacune des cinq zones apicales (tableau XXII).

Pour les zones 1, 2, 3 et 4, les valeurs des pourcentages de noyaux en mitose sont très voisines de celles des pourcentages de noyaux marqués

PLANCHE XX

Fig. a et b. — Histoautoradiographies du méristème jeune du *Pteris cretica* L. après incorporation de thymidine tritiée (activité spécifique 4 Ci/mM, concentration 30 μ Ci/ml). *ca*, cellule apicale. (G. $\times$ 380.)

- a) Après 4 heures d'incorporation, quelques noyaux marqués sont décelables.
- b) Après 11 heures, un plus grand nombre de noyaux sont radioactifs.

Fig. c, d, e et f. — Histoautoradiographies du méristème jeune du *Pteris cretica* L. après incorporation d'uridine tritiée (activité spécifique 4 Ci/mM, concentration 30 μ Ci/ml).

c) Après une incorporation de 30 minutes et un temps de remise en culture de 1 heure, seuls les nucléoles des cellules de la zone latérale (*flèches*) sont radioactifs. (G. $\times$ 1 640.)

d et e) Après une incorporation de 2 heures et un temps de 4 heures avant la fixation, le nucléole de la cellule apicale (*ca*) est marqué (fig. d). Dans les autres zones, les noyaux sont uniformément radioactifs (fig. e). (G. $\times$ 1 640.)

f) Après une incorporation de 2 heures et un temps de remise en culture de 10 heures, seul un marquage cytoplasmique homogène est décelable. (G. $\times$ 660.)

TABLEAUX XX ET XXI. — TABLEAUX DE CONTINGENCE PERMETTANT DE COMPARER PAR LA MÉTHODE DU χ^2 LES POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS DANS LES JEUNES MÉRISTÈMES APRÈS INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIÉE DURANT 4 HEURES. Les valeurs inférieures à 3,84 ne sont pas significatives.

TABLEAU XX. — COMPARAISON ENTRE LES ZONES 1 ET 2

	ZONE 1	ZONE 2
Nombre de noyaux marqués	16	16
Nombre de noyaux non marqués	119	96
<i>Nombre total de noyaux</i>	135	112
	$\chi^2 = 0,31$	

TABLEAU XXI. — COMPARAISON ENTRE LES ZONES 1 ET 3

	ZONE 1	ZONE 2
Nombre de noyaux marqués	16	24
Nombre de noyaux non marqués	119	148
<i>Nombre total de noyaux</i>	135	172
	$\chi^2 = 0,28$	

(comparer tableaux XIX et XXII). Ces résultats prouvent que les synthèses, décelées dans ces quatre zones, sont bien les indices de futures mitoses. Ainsi, *dans le jeune méristème, l'activité mitotique des cellules des zones 1 à 4 est homogène et la durée de leur cycle mitotique doit être très comparable.* Ce résultat met en évidence le rôle histogène joué, dans ces jeunes méristèmes, par la cellule apicale et par ses dérivées.

Pour la zone 5, la valeur de l'index mitotique (1,4) est très différente de celle du pourcentage de noyaux marqués (11,2). Les synthèses d'ADN décelées dans cette zone ne sont donc pas, pour la plupart, suivies de mitoses. Ce marquage met en évidence soit la dernière synthèse d'ADN subie par ces cellules avant leur différenciation définitive, durant la phase G₂, soit des synthèses d'ADN répétées provoquant une endopolyploïdie.

Les pourcentages de noyaux marqués dans les diverses zones apicales, au cours de temps d'incorporation de plus en plus longs (4 h, 8 h, 11 h, 21 h) sont présentés par le tableau XXIII.

TABLEAU XXII. — POURCENTAGES DE NOYAUX EN MITOSE DÉTERMINÉS, DANS LES DIVERSES ZONES APICALES, SUR TRENTE JEUNES MÉRISTÈMES.

	ZONE 1		ZONE 2 à l'aisselle de n	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	apicale	dérivées				
Nombre de noyaux en mitose.	3	14	25	18	22	5
Nombre de noyaux quiescents.	27	99	160	150	236	346
Nombre totale de noyaux.	30	113	185	168	258	351
Pourcentage de noyaux en mitose.	10	11,38	13,51	10,71	8,52	1,42

TABLEAU XXIII. — POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS DÉTERMINÉS DANS LES CINQ ZONES APICALES SUR 30 JEUNES MÉRISTÈMES, APRÈS 4, 8, 11 ET 21 HEURES D'INCORPORATION DE THYMINES TRITIÉES.

TEMPS D'INCORPORATION	ZONE 1 apicales + dérivées	ZONE 2 à l'aisselle du primordium de rang n	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
4 heures ...	11,8	14,8	13,9	11,3	11,2
8 heures ...	19,5	22,6	16,6	26,6	11,6
11 heures ...	25,7	26,6	17,2	30,7	14,9
21 heures ...	36,6	40	19,15	40	32,4

L'augmentation du temps de contact avec le précurseur radioactif provoque un accroissement du pourcentage de noyaux marqués dans toutes les zones apicales (Pl. XX, fig. b). Les valeurs des pourcentages d'incorporation restent très voisines pour les zones 1 et 2, bien qu'elles soient toujours légèrement supérieures pour la zone 2.

2° Incorporation d'uridine tritiée.

La plus ou moins grande rapidité du renouvellement des ARN (ou turn over) dans les diverses zones apicales a été déterminée par des incorporations brèves, suivies d'un temps de remise en culture sur milieu originel de plus en plus long avant la fixation.

Après une incorporation de 30 minutes, si la fixation intervient sans que les plantes aient subi une remise en culture, aucune radioactivité n'est décelable dans aucune zone apicale. Si les méristèmes sont fixés 1 heure après la fin de l'incorporation, les nucléoles des cellules de la zone 2 sont marqués (Pl. XX, fig. c, *flèches*).

Après une incorporation de 2 heures et un temps de remise en culture de 4 heures, le nucléole de la cellule apicale est marqué (Pl. XX, fig. d). Dans les autres zones, les noyaux sont uniformément radioactifs (Pl. XX, fig. e).

Enfin, après une incorporation de 2 heures et un temps de 10 heures entre la fin de l'incorporation et la fixation, seul un marquage cytoplasmique homogène est observable (Pl. XX, fig. f).

Ces résultats montrent que l'incorporation d'uridine tritiée s'effectue le plus rapidement au niveau des cellules de la zone 2, c'est donc dans ces cellules que le renouvellement de l'ARN est le plus rapide. Au contraire, la cellule apicale est celle qui incorpore le plus lentement le précurseur radioactif. Le renouvellement de l'ARN y est plus lent que dans toutes les autres cellules du méristème.

Comme au niveau du méristème adulte, l'ARN radioactif est tout d'abord surtout décelable au niveau nucléolaire. Ceci semble indiquer que la synthèse de l'ARN ribosomal s'effectue dans le nucléole. Lorsque le temps de remise en culture entre la fin de l'incorporation et la fixation augmente, l'ARN radioactif se retrouve au niveau nucléaire puis, enfin, au niveau cytoplasmique.

G. — *Conclusions.*

L'étude de la mise en place du méristème montre que, chez le *Pteris*, comme chez toutes les Fougères, la première feuille F1 provient de l'évolution d'un secteur particulier de l'embryon. Le méristème proprement dit se structure alors que se développent la première feuille et la première racine. Il est constitué par l'apicale entourée d'un petit nombre de cellules qui sont pour la plupart ses dérivées. Ces cellules se divisent activement. La deuxième feuille est vraiment formée par le méristème. La cellule apicale foliaire est isolée de sa première dérivée par un cloisonnement oblique qui intervient dans une cellule particulière, volumineuse, située sur le flanc opposé au point d'attache de F1. Le méristème, très réduit par cette surrection, se régénère grâce à l'activité mitotique de toutes les cellules, *y compris celle de la cellule apicale*. Nous avons souvent remarqué que, chez ces jeunes méristèmes, la cellule apicale de la tige émet une dérivée durant l'individualisation d'une apicale foliaire. Ceci peut être un argument pour donner à la cellule apicale un rôle organisateur, ou régulateur dans le fonctionnement du méristème.

Avant que l'apicale de la troisième feuille ne s'individualise, cinq zones

histologiques sont reconnaissables. *La structuration du méristème est donc rapidement réalisée.*

A ce stade, l'apicale est déjà remarquable par sa forme, par sa taille, par son noyau volumineux mais peu chromatique qui renferme pourtant un gros nucléole pyroninophile et par son cytoplasme vacuolisé, de faible densité, peu pyroninophile, pauvre en protéine totale et en protéines à groupements —SH. Sur une section, 24 % seulement de la surface cellulaire sont occupés par le cytoplasme libre. Le rapport nucléoplasmique (RNP) est de 1/6. Les cellules de la zone 2 ont un rapport nucléoplasmique plus élevé (1/2,5), et en surface, sur section, un pourcentage de cytoplasme libre plus important (36 %). Elles possèdent un noyau chromatique qui renferme un nucléole de faible volume et leur cytoplasme, moins vacuolisé que celui de l'apicale, est aussi plus dense, donc plus riche en ARN. Une zonation apicale est reconnaissable.

Les études histoautoradiographiques après incorporation de thymidine tritiée ont montré que le pourcentage des synthèses d'ADN, prémices de futures divisions, sont comparables dans les cellules des zones 1 et 2. *L'apicale et ses dérivées jouent donc, dans le jeune méristème, un rôle histogène alors que les cellules de la zone 2, à partir desquelles se formeront les apicales foliaires, sont organogènes.* Les cellules de la zone 1 ne peuvent, en effet, être considérées comme organogènes que dans la mesure où elles donnent naissance aux cellules de la zone 2.

III. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

L'application simultanée des techniques histologiques, histochimiques, cytologiques et histoautoradiographiques à l'étude du méristème du *Pteris*, jeune ou adulte, met en évidence les caractéristiques essentielles de la structure et du fonctionnement apical. De plus, l'étude de la mise en place des jeunes primordiums foliaires et des cordons provasculaires qui leur sont associés permet d'établir la genèse du système vasculaire.

A. — *Le méristème adulte.*

Très volumineux, entouré de nombreuses feuilles à l'état d'ébauches, il est constitué par cinq zones ayant chacune des caractères cytologiques et cytochimiques particuliers.

La zone 1 est formée par l'apicale et par les grandes cellules prismatiques qui la bordent. Ces cellules ont à la fois des caractères de cellules différenciées et quelques caractères de cellules méristématiques. En effet, leur rapport nucléoplasmique est faible (1/55) et elles sont très vacuolisées.

Leur cytoplasme libre ne représente que 15 % de la totalité de la surface cellulaire. De faible densité, ce cytoplasme ne renferme que peu d'ARN, de protéines totales et de protéines à groupements —SH, mais il est riche en plastes amyliifères et en lipides. Par contre, ces cellules ont des membranes fines pourvues de très nombreux plasmodesmes qui les mettent en communication entre elles; leurs mitochondries juvéniles sont petites, sphériques et très pauvres en crêtes. Cependant, ces cellules se divisent peu et le renouvellement de leur ARN est lent.

A mesure que l'on se rapproche de la zone 2, les cellules acquièrent un rapport nucléoplasmique beaucoup plus élevé (1/4,5), un cytoplasme moins vacuolisé, plus dense et plus riche en ARN; elles s'enrichissent en composés phénoliques, alors qu'elles s'appauvrissent en plastes amyliifères et en lipides. Ces cellules se divisent plus activement que celles de la zone 1 et le renouvellement de leur ARN est aussi plus rapide.

Dans la zone 2, qui peut être considérée comme un anneau initial, une cellule superficielle subit un phénomène de dédifférenciation et met en place, par un cloisonnement oblique, l'apicale foliaire et sa première dérivée. *Cette zone a donc un rôle organogène.* La surrection d'un primordium réduit considérablement la zone 2 qui se régénère par l'activité mitotique des cellules situées en avant du primordium.

La zone 3 présente des caractères comparables à ceux des cellules méristématiques primaires organogènes de la zone 2.

Par contre, la zone 4, par ses cellules allongées, vacuolisées, riches en ARN et possédant un réticulum endoplasmique assez abondant, a des caractères comparables à ceux des cellules méristématiques secondaires, histogènes. Les cellules de cette zone se divisent fréquemment, elles forment un méristème médullaire.

La zone 5 constitue un soubassement au méristème proprement dit. Formée par un très grand nombre de cellules, c'est elle qui est responsable de l'important volume apical. Dans sa partie superficielle, située directement sous la zone 2, se différencient des anneaux de procambium qui entourent les bases foliaires. Ses autres cellules sont en voie de maturation et un certain nombre d'entre elles subissent soit une dernière synthèse d'ADN avant leur différenciation définitive, soit des synthèses répétées, non suivies de mitose et provoquant une endopolyploidie.

B. — Le méristème jeune comparé au méristème adulte.

Le méristème à l'état jeune est très petit. Le diamètre, à la base du dôme apical, est de 50 μ alors qu'au niveau de l'apex adulte, il atteint 130 à 150 μ . Entre le dôme apical et la dernière feuille formée, la zone 2 mesure 20 μ dans le jeune méristème et 80 μ dans le méristème adulte. La cellule apicale adulte, elle-même, a des dimensions qui sont à peu près le triple de celles de la cellule apicale du méristème jeune. Mais, c'est l'import-

tance de la zone 5, acquise par les méristèmes des plantes adultes, qui provoque la grande variation de volume enregistrée entre les méristèmes des plantes jeunes et ceux des plantes adultes. Ces faits ne paraissent pas être comparables chez toutes les Fougères. En effet, chez le *Pteridium*, GOTTLIEB et STEEVES [28], constatent que, si au cours de la vie de la plante, le méristème augmente de volume, la cellule apicale reste de taille constante et que seul le nombre de cellules qui la bordent augmente.

La structure histologique acquise par le méristème, dès la formation de la feuille de rang 2, est tout à fait comparable à celle décrite dans les plantes adultes (voir Pl. I, fig. c, et Pl. XIII, fig. b). Dans les deux cas, cinq zones sont repérables. Les cellules de la zone 1 possèdent toujours les caractères les plus différenciés mais leur rapport nucléoplasmique est beaucoup plus élevé dans le méristème jeune ($1/4$) que dans le méristème adulte ($1/15$). De même en surface, sur une section, le pourcentage de cytoplasme libre de l'apicale jeune (24 %) est plus important que celui de l'apicale adulte (15,6 %).

Les cellules de la zone 1 du jeune méristème sont plus riches en ARN que celles du méristème adulte, elles ne contiennent pas de lipides et l'amidon présent dans les plastes sous forme de petits grains seulement, n'est décelable qu'en microscopie électronique.

La zone 1 du jeune apex est donc plus méristématique que celle de l'apex adulte. Elle a également une activité mitotique beaucoup plus intense et la cellule apicale, elle-même, se recloisonne fréquemment. Les cellules de la zone 1, dans le jeune méristème, ont donc un rôle *histogène*. Ces cellules ont un métabolisme de l'ADN tout à fait comparable à celui des cellules de la zone 2. Cependant, comme dans le méristème adulte, le renouvellement de l'ARN est plus lent dans la zone 1 que dans les autres zones apicales. La dissymétrie existant dans cette zone entre le métabolisme de l'ADN et celui de l'ARN pourrait expliquer la rapide différenciation de l'apicale.

Dans le méristème jeune, comme dans le méristème adulte, les zones 2 et 3 sont les plus méristématiques, leur activité mitotique est grande et le renouvellement de leur ARN est rapide. Comparées à celles du méristème adulte, les cellules des zones 2 et 3 du méristème jeune sont plus méristématiques : leur rapport nucléoplasmique est plus élevé : $1/2,5$ pour $1/5$, elles sont moins vacuolisées, plus riches en ARN et ne contiennent que très peu d'amidon. La zone 4 fonctionne dans les deux cas comme un méristème médullaire. Mais, dans les jeunes plantes, le système vasculaire est une protostèle et les cellules provenant de l'activité de cette zone évolueront en cellules vasculaires. Dans la zone 5 des jeunes méristèmes, la différenciation des trachéides scalariformes est très précoce.

Le processus de mise en place des apicales foliaires et celui de construction des primordiums sont comparables dans les deux types de méristème. Ils ont lieu dans la zone 2, ce qui confère aux cellules de cette zone un rôle *organogène*.

Dans les jeunes plantes étudiées qui n'ont construit au plus que huit feuilles, le nombre de racines est le même que celui des feuilles formées. De plus, la feuille et la racine de même rang naissent simultanément. Ce phénomène évoque la formation d'unités morphologiques indépendantes, mais successives, s'emboîtant les unes dans les autres. Chaque unité morphologique est, en fait, la « phyllorhize » de Chauveaud. Selon cet auteur, c'est par la coalescence de la base de chaque phylle, appelée « caule », que la tige serait formée.

C. — La cellule apicale.

Les problèmes posés par les méristèmes des Ptéridophytes sont essentiellement ceux du rôle et du fonctionnement de la cellule apicale.

Pour la majorité des auteurs, cette cellule est une initiale comparable à celle qui régit le fonctionnement du méristème des Bryophytes. La cellule apicale, par les divisions rythmiques de ses trois faces, fournirait les cellules des autres régions du méristème dans lesquelles s'effectuent l'organogenèse et la maturation des différents tissus. Elle serait donc à l'origine de toute la plante. Pourtant les études cytologiques de BUVAT et LIARD chez *Equisetum* [7], de BUVAT chez *Selaginella* [5] et de SOS-SOUNTZOV chez *Marsilea* [57] montrent que l'apicale et ses voisines sont les cellules les plus différenciées du méristème et que leurs caractères ne permettent pas de penser qu'elles puissent avoir une intense activité mitotique.

Pour WARDLAW [79 à 82, 74, 76 et 77], l'apicale et ses dérivées, peu méristématiques et mitotiquement peu actives, sont cependant des « initiales » puisqu'il suffit que ces cellules se divisent un nombre très restreint de fois pour fournir le matériel cellulaire aux zones voisines.

Afin d'étudier l'activité de l'apicale par rapport aux autres cellules et d'en déduire son fonctionnement, deux auteurs ont utilisé des techniques histautoradiographiques sur des méristèmes jeunes ou adultes.

— GIFFORD, chez le *Ceratopteris thalictroides* [23], montre qu'après trois jours d'incorporation de thymidine tritiée, la cellule apicale d'un jeune sporophyte synthétise de l'ADN de la même façon que les autres cellules du méristème. Ce résultat prouve donc, bien que le temps d'incorporation utilisé soit très long, que cette cellule peut se diviser et jouer, par son activité mitotique, un rôle d'initiale.

— SOS-SOUNTZOV [58], dans le méristème adulte du *Marsilea drumondii*, remarque que la cellule apicale incorpore rarement et faiblement la thymidine tritiée. Ce résultat correspond bien au fait qu'on ne rencontre que très peu souvent cette cellule en cours de division. Le pourcentage d'apicales marquées n'augmentant pas en fonction du temps d'incorporation, cet auteur conclut à son comportement particulier. Cependant, malgré la grande quantité d'apicales observées par cet auteur (près de 1 000), le

nombre de plantes utilisées, donc le nombre d'apicales caulinaires impliquées dans chaque type d'expérience reste faible (de 8 à 12). L'erreur absolue commise sur les pourcentages calculés est donc extrêmement grande. Les *variations* ou l'absence de variations de ces pourcentages ne peuvent pas avoir de réelle signification. Ces résultats permettent seulement de conclure que dans un méristème adulte la cellule apicale est peu active.

D'après les travaux de ces deux derniers auteurs, l'apicale des Pteridophytes semble donc avoir un fonctionnement différent selon qu'elle appartient à un méristème jeune (*Ceratopteris*) ou à un méristème adulte (*Marsilea*).

1° La cellule apicale du méristème jeune.

Chez le *Pteris*, l'apicale tétraédrique du méristème jeune, bien qu'elle possède déjà des caractères de cellule différenciée, se recloisonne cependant fréquemment en donnant des dérivées plus petites et parallélipédiques. Cette division *inégaie* provoque une répartition différente du cytoplasme dans chacune des deux cellules. C'est ce type de division qui permettrait [6, 18] à une lignée cellulaire d'évoluer en se différenciant en un tissu particulier, alors que l'autre lignée (la cellule apicale mère) conserverait intégralement ses caractères et subsisterait sans changement. Ce fonctionnement permet de penser qu'à ce stade, la cellule apicale joue un rôle histogène. On peut même lui attribuer un rôle organogène dans la mesure où elle fournit à la fois les cellules de la zone 2, dont certaines évolueront en apicale foliaire, et les cellules à partir desquelles s'élaboreront les différents tissus de la tige. Il est donc bien évident que n'importe quelle cellule d'une des cinq zones méristématiques provient bien, en dernier ressort, de l'apicale, mais un très grand nombre de générations cellulaires les sépare.

Un tel fonctionnement de l'apicale a été remarqué par WARDLAW dans les méristèmes de petite taille [72]. Cependant, pour SOSSOUNTZOV [58], les apicales des rameaux latéraux du *Marsilea* appartenant à de petits méristèmes ont une activité mitotique aussi faible sinon plus que celle de l'apicale de la tige principale.

Il est donc difficile de préciser si un tel fonctionnement de l'apicale est caractéristique d'un méristème jeune ou d'un méristème de faible dimension.

Le recloisonnement de l'apicale de la tige semble souvent coïncider, chez le *Pteris*, avec la mise en place d'une apicale foliaire. Il existerait une relation entre le fonctionnement de l'apicale et le rythme plastochronique. Si cette relation se trouve confirmée, on pourra alors attribuer à la cellule apicale un rôle *régulateur* dans le fonctionnement des centres générateurs des hélices foliaires. Cependant, WARDLAW [69] a montré, chez le *Dryopteris aristata*, que la destruction de l'apicale ne semble pas perturber l'apparition de nouveaux primordiums foliaires dans le méristème adulte.

Ce résultat issu de la morphologie expérimentale semble donc aller à l'encontre de l'hypothèse du rôle régulateur de l'apicale dans le fonctionnement plastochronique.

2° *La cellule apicale du méristème adulte.*

A mesure que la plante devient adulte, le volume du méristème s'accroît, le nombre des cellules qui le constituent augmente et la cellule apicale triple à peu près ses dimensions. En même temps, elle se différencie de plus en plus. Cette cellule n'a jamais été observée en division et si elle est capable d'incorporer de l'ADN, c'est toujours très rarement et très faiblement. Les difficultés techniques rencontrées ne nous ont pas permis, pour le moment, de réussir des incorporations de longue durée, donc d'avoir quelques précisions sur la durée du cycle mitotique de cette cellule. Nous ne pouvons donc que poser des hypothèses de travail sur le fonctionnement et le rôle de la cellule apicale adulte.

Première hypothèse. — Les synthèses d'ADN subies par l'apicale sont rythmiques.

Comme les autres cellules du méristème, la cellule apicale se divise régulièrement en émettant des dérivées. Elle joue alors toujours un rôle histogène et organogène, mais ces rôles sont masqués par un cycle mitotique très lent.

En effet, la cellule apicale du méristème des Bryophytes, qui met en place les segments foliaires, a un cycle mitotique dont la durée a été estimée à 360 heures [34]. Une durée au moins aussi longue peut donc être envisagée pour une cellule apicale de Filicinée. La mitose ne durant que quelques heures, les chances d'observer une apicale en cours de recloisonnement sont donc très faibles. De plus, la chromatine très dispersée dans le noyau volumineux expliquerait la faible intensité du marquage lorsqu'il existe.

Deuxième hypothèse. — Les synthèses d'ADN dans la cellule apicale sont occasionnelles et non suivies de mitose.

Dans cette hypothèse, l'apicale subirait des phénomènes d'endopolyploïdie. D'AMATO et AVANZI [15, 16] ont en effet montré, par des mesures cytophotométriques, que la cellule apicale de la tige d'*Equisetum* [16] et celle de la racine du *Marsilea* [15] sont polyploïdes. Si ces résultats se trouvaient généralisés, ils permettraient d'expliquer l'absence de mitose ainsi que l'aspect morphologique particulier de ces cellules.

Troisième hypothèse. — Les synthèses décelées dans l'apicale sont occasionnelles, non suivies de mitose et ne provoquent pas d'endopolyploïdie.

Dans ce cas, les rares synthèses décelées correspondraient à un renouvellement de l'ADN nécessaire pour la survie d'une cellule devenue passive. PELC en 1964 [48] a en effet montré que des incorporations de thymidine

tritiée pouvaient avoir lieu dans des tissus ne se divisant plus. Pour l'auteur, ces marquages sont dus à des synthèses provoquant un renouvellement métabolique, partiel ou total, de l'ADN. Au cours de ce processus, les chaînes d'ADN se dupliqueraient, mais celles ayant servi de modèles seraient lysées. L'ADN serait ainsi renouvelé sans qu'il y ait ni mitose ni endomitose et le génome à $2n$ serait conservé. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'absence de mitose, ainsi que le faible marquage obtenu. Mais elle correspond en fait à la mise en évidence d'un renouvellement ou « turn over » de l'ADN jusqu'ici très peu reconnu par les auteurs.

Dans les deux dernières hypothèses, la cellule apicale ne fournit plus de dérivées. Le plan apical, acquis à l'état jeune, est maintenu; ce sont les cellules de la zone 1, excepté l'apicale, qui fournissent aux autres zones méristématiques le matériel cellulaire.

Toutefois, quel que soit son fonctionnement, la cellule apicale dans le méristème adulte joue un rôle de réserve puisque amidon et lipides y sont toujours présents. Ces réserves doivent être redistribuées aux autres cellules méristématiques par les nombreux plasmodemes qui relient l'apicale à ses voisines.

Tous les travaux expérimentaux [79 à 81] ont montré que dans la plante adulte ou jeune, la cellule apicale est indispensable au bon fonctionnement continu du méristème. Sa destruction, si elle n'entraîne pas rapidement la dégénérescence du méristème, est suivie de la formation d'une nouvelle apicale. De ce fait, certains auteurs admettent [12, 68, 69] que cette cellule joue un rôle de régulation sur les autres cellules méristématiques. Elle a également un rôle sur l'organogenèse en général puisque sa présence inhibe la formation des bourgeons axillaires. Mais, il faut penser aussi que le métabolisme de l'apicale dépend de celui des autres zones du méristème. Le fonctionnement de l'apicale doit donc être envisagé comme étant la résultante de son activité et de sa réceptivité.

Des recherches actuellement en cours permettront d'établir le véritable rôle de l'apicale dans le méristème adulte. Celui-ci ne peut, en effet, être réellement éclairci que par la détermination de la durée du cycle mitotique et par l'estimation de l'état diploïde, tétraploïde ou octoploïde du noyau de cette cellule. De même, l'étude des relations qui s'établissent entre le comportement de l'apicale et l'individualisation des apicales foliaires ainsi que des examens enzymologiques expliquant le devenir des substances mises en réserve à son niveau permettront de préciser encore son fonctionnement, mais surtout son métabolisme.

D. — *Le système vasculaire.*

Dans la tige des jeunes plantes dont le méristème n'a encore formé que huit feuilles au plus, le système vasculaire est une protostèle. Elle est initiée au niveau apical par la différenciation en éléments vasculaires des

cellules de la zone 5 auxquels viennent s'adjoindre les faisceaux procambiaux des jeunes feuilles à mesure de leur formation. *La protostèle a donc une origine à la fois caulinare et foliaire.*

Lorsque la plante est adulte, la tige n'est plus un axe dressé mais un rhizome rampant dont le système vasculaire est une dictyostèle. Ce système peut être défini comme un réseau complexe de faisceaux conducteurs qui

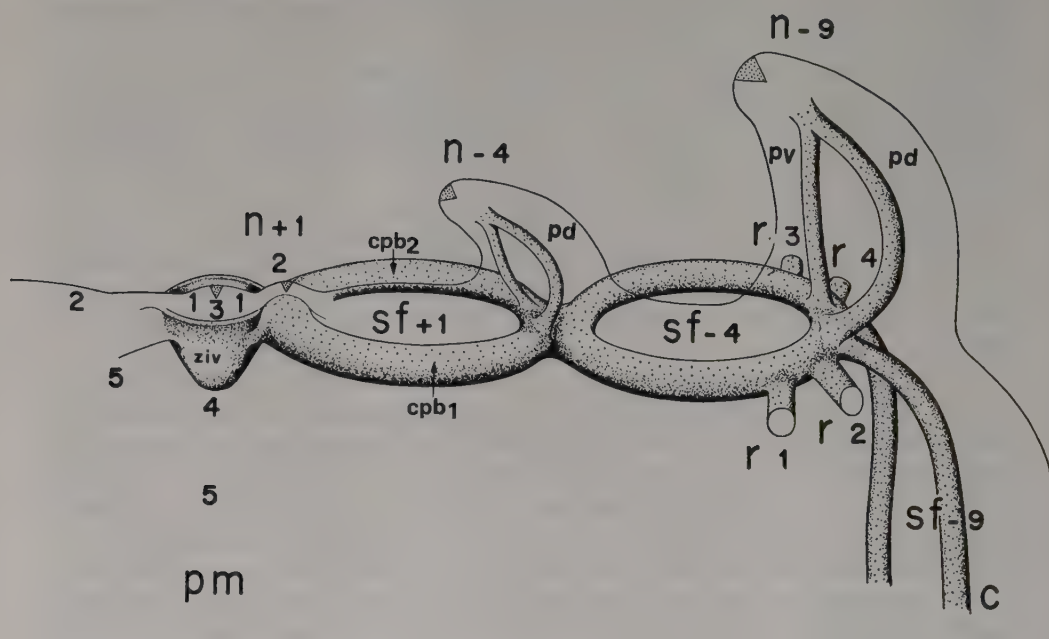


FIG. 21. — Diagramme représentant schématiquement la mise en place, au niveau apical, des éléments vasculaires constitutifs de la dictyostèle. Le long d'une même orthostique les éléments vasculaires des unités foliaires sont contigus. Chaque unité foliaire est constituée d'un segment foliaire Sf+1, Sf-4, Sf-9 et du primordium foliaire proprement dit n+1, n-4, n-9.

Les éléments vasculaires naissent en contiguïté avec la zone d'initiation vasculaire caulinare (ziv).

cpb1, cpb2, cordons vasculaires des segments foliaires; c, parenchyme cortical provenant de l'évolution du parenchyme dorsal (pd) des ébauches foliaires; pm, pseudo-moelle, issue du fonctionnement, analogue à un méristème médullaire, de la base de la zone d'initiation vasculaire (zone 4); pv, parenchyme ventral des ébauches foliaires; r₁, r₂, r₃, r₄, départ de la vascularisation des 4 racines toujours associées à une feuille; 1, 2, 3, 4, 5, les diverses zones apicales.

ménagent entre eux des mailles en s'anastomosant. A l'extérieur du réseau vasculaire se trouve un parenchyme cortical, à l'intérieur, un tissu parenchymateux assimilé à une moelle.

Le schéma de la figure 21 montre la mise en place des différents éléments vasculaires et permet d'expliquer la valeur ontogénique du rhizome.

Au niveau apical, les unités foliaires se forment successivement. Chaque unité foliaire est constituée d'une part par un segment foliaire dont le système vasculaire est un double faisceau (*cpb1* et *cpb2*), d'autre part, par la fronde proprement dite qui possède elle aussi un double faisceau procambial. Le segment foliaire et sa vascularisation se forment précocement en contiguïté avec le système vasculaire de l'unité foliaire précédente placée sur la même orthostique. Ainsi, le long d'une même orthostique, les systèmes vasculaires des différentes unités foliaires sont contigus. Les feuilles du rhizome étant disposées selon cinq orthostiques, cinq systèmes vasculaires comparables à celui présenté par la figure 21 se construisent donc simultanément au niveau apical.

Les cellules procambiales qui vont s'associer pour former les faisceaux vasculaires du segment foliaire ou de la fronde sont initiées *en continuité* avec la zone d'initiation vasculaire (*ziv*) constituant une cupule sous le dôme axial. Cette zone d'initiation vasculaire est purement caulinaire. Le système vasculaire du rhizome a donc une origine à la fois foliaire et caulinaire. Toutefois, les éléments d'origine foliaire, c'est-à-dire ceux du segment foliaire, sont prépondérants.

La zone d'initiation vasculaire est de plus constamment située au-dessus de la dernière ébauche en cours de formation (fig. 21, *ziv*) et, de ce fait, aucune continuité n'existe entre le parenchyme ventral de l'ébauche $n+1$ et les tissus du centre du rhizome (*pm*). Cependant, à mesure que le segment foliaire et la vascularisation qui lui est associée se développent, cette continuité s'établit au niveau de la partie centrale du segment foliaire (fig. 21, *sf+1*), délimitée par l'anneau vasculaire (*cpb1* et *cpb2*). Cette portion de segment foliaire pourrait donc être considérée comme une « fenêtre foliaire » dont la formation serait alors totalement différente de celle présentée par les Angiospermes. Mais les mailles qui sont visibles dans le réseau vasculaire d'une tige différenciée de *Pteris* ne sont pas uniquement issues de fenêtres foliaires. Elles sont dues, pour la plupart, à des anastomoses entre divers faisceaux vasculaires. D'après ESAU [22], la brèche foliaire ne serait très nette, surtout dans la partie différenciée de la tige, que chez les végétaux qui possèdent une siphonostèle à brèche. De toute façon, la notion de brèche foliaire, purement anatomique, n'apporte aucun éclaircissement à la compréhension de la construction de la stèle qui ne peut être réellement définie qu'à partir du niveau apical.

A mesure que le rhizome s'accroît, les cinq systèmes vasculaires qui se construisent simultanément au niveau apical et qui constituent dix faisceaux à l'origine s'anastomosent pour former trois à quatre volumineux faisceaux qui évoluent en méristèles. Ces dernières sont visibles sur une section transversale effectuée dans une partie différenciée du rhizome. A l'extérieur de ces méristèles, le parenchyme cortical est issu de l'évolution du parenchyme dorsal des ébauches. Au centre du rhizome, les cellules parenchymateuses proviennent de la zone 4 qui fonctionne à la manière d'un méristème médullaire. Comme la zone 4 constitue la base de la zone d'initiation

vasculaire, le tissu parenchymateux formé par son activité a été nommé pseudo-moelle.

Le passage protostèle-dictyostèle n'a pas été précisé, seules en effet ont été étudiées des plantes très jeunes n'ayant formé que quelques feuilles et des plantes déjà tout à fait adultes.

On peut penser que la zone 4 des jeunes méristèmes, qui donne les cellules se différenciant en éléments vasculaires, préfigure la zone d'initiation vasculaire caulinaire reconnaissable dans les méristèmes adultes.

BIBLIOGRAPHIE

1. ANDRES (J.), 1968. — Ontogénie du méristème apical de *Marsilea vestita* depuis l'embryon jusqu'à l'édification des premières feuilles. *C. R. Acad. Sc.*, **266**, p. 1842-1844.
2. BARNETT (R. J.) et SELIGMAN (A. M.), 1952. — Histochemical demonstration of protein bound sulfhydryl groups. *Science*, **116**, p. 323-327.
3. BONNOT (E. J.), 1968. — Sur la structure et les propriétés de la cellule apicale du gamétophyte feuillé des Bryales. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, mémoire, **115**, p. 208-222.
4. BOWES (B. G.), 1965. — The ultrastructure of the shoot apex and young shoot of *Glechoma hederacea* L. *La Cellule*, **65**, p. 349-356.
5. BUVAT (R.), 1955. — Sur la structure et le fonctionnement du point végétatif de *Selaginella caulescens* Spring., var. *amoena*. *C. R. Acad. Sc.*, **241**, p. 1833-1836.
6. BUVAT (R.), 1965. — Les bases cytologiques de la différenciation et de la dédifférenciation chez les plantes. *Handbuch d. Pflanzenphysiologie*, XV/1, p. 100-145.
7. BUVAT (R.) et LIARD (O.), 1953. — Interprétation nouvelle du fonctionnement de l'apex d'*Equisetum arvense* L. *C. R. Acad. Sc.*, **237**, p. 88-90.
8. CAVALIE (G.), 1964. — Mise en évidence par chromatographie sur papier d'acides phénoliques et de coumarines dans les feuilles de *Celeri*. *C. R. Acad. Sc.*, **258**, p. 689-691.
9. CHIPCHASE (M. I. H.) et BIRNSTIEL (M. L.), 1963. — On the nature of nucleolar RNA. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **49**, p. 692-699.
10. CLOWES (F. A. L.) et JUNIPER (B. E.), 1963. — The fine structure of the quiescent centre and neighbouring tissues in root meristems. *J. Exp. Bot.*, **15**, p. 622-630.
11. CROSS (G. L.), 1931. — Meristem in *Osmunda cinnamomea*. *Bot. Gaz.*, **91**, p. 65-76.
12. CUSICK (F.), 1953. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XXII Morphogenesis in *Selaginella Wiedenovii*. *Ann. Bot.*, nouv. série, **17**, p. 369-385.
13. D'AMATO (F.), 1952. — New evidence on endopolyploidy in differentiated plant tissues. *Caryologia*, **4**, p. 121-144.
14. D'AMATO (F.), 1965. — Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia*, **17**, p. 41-50.
15. D'AMATO (F.) et AVANZI (S.), 1965. — DNA content, DNA synthesis and mitosis in the root apical cell of *Marsilea strigosa*. *Caryologia*, **18**, p. 383-394.
16. D'AMATO (F.) et AVANZI (S.), 1967. — The shoot apical cell of *Equisetum arvense*, a quiescent cell. *Caryologia*, **21**, p. 83-89.
17. DASANAYAKE (M. D.), 1960. — Aspects of morphogenesis in a dorsiventral fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Ann. Bot.*, nouv. série, **47**, p. 834-837.
18. DUPRAW (E. S.), 1968. — *Cell and molecular biology*. Academic Press, New York.
19. DURAND-RIVIERES (R.), 1964. — Contribution à la morphogenèse du sporophyte de *Pteris longifolia* L. Thèse de Doctorat, Montpellier.
20. ELLIS (I.), 1933. — The influence of sulfhydryl groups and respiration on the rate of cell division. *J. Cell Comp. Physiol.*, **4**, p. 127-139.

21. ESAU (K.), 1953. — Primary vascular differentiation in plants. *Biol. Rev.*, **29**, p. 46-86.
22. ESAU (K.), 1965. — Plant anatomy, 2^e édit. J. Wiley and Sons, New York.
23. GIFFORD (E. M.), 1960. — Incorporation of H³-thymidine into shoot and root apices of *Ceratopteris thalictroides*. *Amer. J. Bot.*, **47**, p. 834-837.
24. GIFFORD (E. M.) et STEWART (K. D.), 1967. — Ultrastructure of the shoot apex of *Chenopodium album* and certain other seed plants. *J. Cell Biol.*, **33**, p. 131-141.
25. GOLDSTEIN (L.) et PLAUT (W.), 1955. — Direct evidence for nuclear synthesis of cytoplasmic ribose nucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **41**, p. 874-880.
26. GOTTLIEB (J. E.), 1958. — Development of the Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. I. General morphology of the sporeling. *Phytomorphology*, **8**, p. 184-193.
27. GOTTLIEB (J. E.), 1959. — Development of the Bracken fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. II. Stelar ontogeny of the sporeling. *Phytomorphology*, **9**, p. 91-105.
28. GOTTLIEB (J. E.) et STEEVES (T. A.), 1961. — Development of the Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. III. Ontogenetic changes in the shoot apex and in the pattern of differentiation. *Phytomorphology*, **19**, p. 230-242.
29. GOTTLIEB (J. E.) et STEEVES (T. A.), 1965. — Experimental control of the shoot system in sporelings of *Pteridium aquilinum*. *Amer. J. Bot.*, **52**, p. 359-368.
30. GRANBOULAN (N.) et GRANBOULAN (P.), 1964. — I. Mise en évidence de chromatine à l'intérieur du nucléole. *Exptl. Cell Res.*, **34**, p. 71-87.
31. GRANBOULAN (N.) et GRANBOULAN (P.), 1965. — II. Etude des sites de synthèse du RNA dans le nucléole et le noyau. *Exptl. Cell Res.*, **38**, p. 604-619.
32. HAGEMANN (W.), 1964. — Vergleichende Untersuchungen Zur Entwicklungsgeschichte des Farnsprosses. I. Morphogenese und Histogenese am Sproßscheitel leptosporangiaten Farne. *Beitr. Biol. Pflanzen.*, **40**, p. 27-64.
33. HALLET (J. N.), 1969. — Remarques sur la structure et sur le fonctionnement de l'apex du *Polytrichum formosum* Hedw. *C. R. Acad. Sc.*, **268**, p. 916-919.
34. HALLET (J. N.), 1969. — Durée du cycle mitotique dans le point végétatif du *Polytrichum formosum* Hedw. *C. R. Acad. Sc.*, **269**, 2088-2090.
35. HOFMEISTER (W.), 1857. — Beitrage Zur Kenntniss der Gefässkryptogamen. *Abh. Kön. Säch. Ges. Wiss.*, **3**, p. 603-682.
36. KAPLAN (R.), 1937. — Ueber die Bildung der Stele aus dem Urmeristem von Pteridophyten und Spermatophyten. *Planta*, **27**, p. 224-268.
37. LANCE-NOUGARÈDE (A.), 1963. — Etude morphologique des rameaux du *Lycopodium selago*. *C. R. Acad. Sc.*, **257**, p. 2698-2702.
38. LAURENT (S.), 1966. — Contribution à l'étude des tanins et des autres substances phénoliques hydrosolubles, élaborées par les prothalles de Filicinées. *Thèse de Doctorat*, Paris.
39. LISON (L.), 1953. — Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes, vol. I et II, Gauthier-Villars, Paris (2^e édit., 1960).
40. MASON (H. S.), 1955. — Comparative biochemistry of the phenolase-complex. *Advances in Enzymology*, **16**, p. 105-108.
41. MAZIA (D. P.), BREWER (P. A.) et ALFERT (M.), 1953. — The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol. *Biol. Bull.*, **104**, p. 57-67.
42. MICHAUX (N.), 1968. — Etude cytologique du méristème apical du *Pteris cretica* L. *C. R. Acad. Sc.*, **267**, p. 1442-1444.
43. MICHEL-DURAND (E.), 1928. — Recherches sur les composés tanniques. *Rev. gén. Bot.*, **40** et **41**.
44. MOUREU (C.) et DUFRASSE (C.), 1923. — Sur l'autoxydation : essai sur le mécanisme de l'action anti-oxygène. *C. R. Acad. Sc.*, **176**, p. 624-629.
45. NAEGELI (C.), 1845. — Wachsthumsgeschichte der Laub und Lebermoose. *Zeitschr. f. Wissenschaft. Botanik*, **2**, p. 138-210.
46. NITSAN (J.) et LANG (A.), 1966. — DNA synthesis in the elongating non dividing cells of the lentil epicotyl and its promotion by gibberellin. *Plant Physiol.*, **41**, p. 965-970.

47. NOUGARÈDE (A.), 1967. — Experimental cytology of the shoot apical cells during vegetative growth and flowering. *Intern. Rev. Cyt.*, **21**, p. 203-251.
48. PELC (S. R.), 1964. — Labelling of DNA and cell division in so called non-dividing tissues. *J. Cell Biol.*, **22**, p. 21-28.
49. PENMAN (S.), SMITH (J.) et HOLTZMANN (E.), 1966. — Ribosomal RNA synthesis and processing in a particulate site in the *Hela* cell nucleus. *Science*, **154**, p. 786-789.
50. PENON (G.), 1951. — Parastiques et hélices foliaires chez deux Filicinales : *Polystichum Filix mas* Roth et *Athyrium Filix femina* Roth. Librairie générale de l'Enseignement, Paris, p. 1-42.
51. PERRY (R. P.), 1965. — The nucleolus and the synthesis of ribosomes. *Natl. Cancer Inst.*, Monographie 18, p. 326-340.
52. PERRY (R. P.), 1966. — On ribosome biogenesis. *Natl. Cancer Inst.*, Monographie 23, p. 527-545.
53. PLANTEFOL (L.), 1947. — Hélices foliaires, point végétatif et stèle chez les dicotylédones. *Rev. gén. Bot.*, **54**, p. 49-80.
54. REEVE (R. M.), 1959. — Histological and histochemical changes in developing and ripening peaches. III. Catechal tannin content per cell. *Amer. J. Bot.*, **46**, p. 645-650.
55. SLUKHAJ (S. J.) et MIKHEEVA (T. J.), 1955. — Influence de certaines conditions de croissance sur la teneur en tanin et en extrait sec des feuilles de *Rhus cotinus* L. *Dop. Akad. Nauk. Ukrain. R.S.R.*, **6**, p. 551-554.
56. SOMA (K.), 1966. — On the shoot apices of *Dicranopteris dichotoma* and *Diplopterium glaucum*. *Bot. Mag.*, Tokyo, **79**, p. 457-466.
57. SOSSOUNTZOV (L.), 1965. — Etude morphologique et histologique du sporophyte de la Fougère aquatique *Marsilea drummondii* A. Br., cultivée *in vitro*; structure et fonctionnement de l'apex. I. Le sporophyte normal. *Rev. Cytol. et Biol. vég.*, XXVIII, fasc. 3, p. 175-210.
58. SOSSOUNTZOV (L.), 1969. — Incorporation de précurseurs tritiés des acides nucléiques dans les méristèmes apicaux du sporophyte de la Fougère aquatique, *Marsilea drummondii* A. Br. *Rev. gén. Bot.*, **76**, p. 109-156.
59. SRIVASTAVA (L. M.), 1966. — On the fine structure of the cambium of *Fraxinus americana* L. *J. Cell Biol.*, **31**, p. 79-93.
60. STEEVES (T. A.), 1963. — Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea* L. The shoot apex. *J. Indian Bot. Soc.*, **42** A, p. 225-236.
61. STEEVES (T. A.) et BRIGGS (W. R.), 1958. — Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea* L. The origin and early development of vegetative fronds. *Phytomorphology*, **8**, p. 60-72.
62. VAN WISSELINGH (C.), 1910. — On the tests for tanning in the living plant and on the physiological significance of tannin. *Proc. K. Akad. Wetensch. Amst.*, XII, p. 685-705.
63. VERDOORN (F.), 1938. — Manual of pteridology. Martinus Nijhoff, The Hague.
64. VLADESCO (A.), 1934. — Recherches morphologiques et expérimentales sur l'embryogénie et l'organogénie des Fougères leptosporangiées. *Thèse de Doctorat*, Paris.
65. WARDLAW (C. W.), 1944. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. 3. Stelar morphology : The initial differentiation of vascular tissue. *Ann. Bot.*, nouv. série, **8**, p. 173-187.
66. WARDLAW (C. W.), 1944. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. 4. Stelar morphology : experimental observations on the relation between leaf development and stelar morphology in species of *Dryopteris* and *Onoclea*. *Ann. Bot.*, nouv. série, **8**, p. 387-399.
67. WARDLAW (C. W.), 1945. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. 5. Stelar morphology : the development of the vascular system. *Ann. Bot.*, nouv. série, **9**, p. 173-188.
68. WARDLAW (C. W.), 1947. — Experimental investigations of the shoot apex of *Dryopteris aristata* Druce. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, B, **232**, p. 343-384.

69. WARDLAW (C. W.), 1948. — Further experimental observations on the shoot apex of *Dryopteris aristata* Druce. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, London, B, **233**, p. 415-451.
 70. WARDLAW (C. W.), 1949. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XIV. Leaf formation and Phyllotaxis in *Dryopteris aristata* Druce. *Ann. Bot.*, nouv. série, **13**, p. 163-198.
 71. WARDLAW (C. W.), 1951. — Comparative morphogenesis in Pteridophytes and Spermatophytes by experimental methods. *New Phytol.*, **50**, p. 127-134.
 72. WARDLAW (C. W.), 1953. — Comparative observations on the shoot apices of vascular plants. *New Phytol.*, **52**, p. 195-209.
 73. WARDLAW (C. W.), 1955. — Embryogenesis in plants. Methuen et Co. LTD, London.
 74. WARDLAW (C. W.), 1956. — Generalization on the apical meristem. *Nature*, **178**, p. 1427.
 75. WARDLAW (C. W.), 1956. — On the shoot apex of the Bird's Nest Fern, *Asplenium nidus* L. *Ann. Bot.*, nouv. série, **20**, p. 363-374.
 76. WARDLAW (C. W.), 1957. — On the organization and reactivity of the shoot apex in vascular plants. *Amer. J. Bot.*, **43**, p. 176-185.
 77. WARDLAW (C. W.), 1957. — The reactivity of the apical meristem as ascertained by cytological and other techniques. *New Phytol.*, **56**, p. 221-228.
 78. WARDLAW (C. W.), 1958. — Reflections on the unity of the embryonic tissues in Ferns. *Phytomorphology*, **8**, p. 323-327.
 79. WARDLAW (C. W.), 1962. — Apical organization and differential growth in Ferns. *J. Linn. Soc. (Bot.)*, **58**, 373, p. 385-400.
 80. WARDLAW (C. W.), 1965. — The morphogenetic role of apical meristems : fundamental aspects. *Handbuch d. Pflanzenphysiologie*, Encyclopedia of Plant physiology, p. 443-451.
 81. WARDLAW (C. W.), 1965. — The organization of the shoot apex. *Handbuch d. Pflanzenphysiologie*, XV/1, p. 966-1076.
 82. WARDLAW (C. W.), 1966. — Morphogenesis in plants. A contemporary study. Methuen and Co. LTD, London.
 83. WHALEY (W. G.), MOLLENHAUER (H. H.) et LEECH (J. H.), 1960. — The ultrastructure of the meristematic cell. *Amer. J. Bot.*, **47**, p. 401-449.
 84. WHITE (T.), 1957. — Tannins. Their occurrence and significance. *J. Sci. Food Agric.*, G. B., **8**, p. 377-385.
-

STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DU MÉRISTÈME APICAL DU *PTERIS CRETICA* L.

II. — ÉTUDE CYTOPHOTOMÉTRIQUE

Par M^{me} Nicole MICHAUX

Laboratoire de Cytologie et Morphogenèse végétales,
bâtiment L, 9, quai Saint-Bernard, 75-Paris, 5^e.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	149
I. — LA MÉTHODE CYTOPHOTOMÉTRIQUE	151
A. — Principe	151
B. — Historique et critique de la méthode	152
C. — La méthode des deux longueurs d'onde	156
D. — Interprétation des résultats	158
II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUE	159
A. — Matériel	159
1° Les méristèmes des jeunes sporophytes	159
2° Les méristèmes de plantes adultes	159
B. — Préparation des méristèmes pour les mesures cytophotométriques	161
1° Fixation des échantillons et obtention des sections	161
2° Hydrolyse et coloration	163
C. — Mesures cytophotométriques	163
1° Détermination des deux longueurs d'onde	163
2° Mesures	164
3° Interprétation des résultats	165
III. — RÉSULTATS	165
A. — Le méristème jeune	165
1° Contenu en ADN des zones 1 à 4	165
2° Caractéristiques de la zone 5	169
3° Interprétation des pourcentages de noyaux 2 C-4 C	171

B. — <i>Le méristème adulte</i>	173
1° Expression des résultats	173
2° Répartition de la polyploïdie dans le méristème.....	173
3° Les zones 2 et 4	176
4° La zone 5	176
IV. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES	178
A. — <i>Fonctionnement et rôle de la cellule apicale dans les méristèmes jeunes et adultes</i>	178
B. — <i>Liaison polyploïdie-différenciation cellulaire</i>	179
C. — <i>Schéma fonctionnel du méristème apical jeune et du méristème adulte du Pteris cretica L</i>	182
BIBLIOGRAPHIE	186

RÉSUMÉ

Afin de confirmer et de compléter les résultats précédents obtenus sur la structure et le fonctionnement du méristème apical jeune et adulte du *Pteris cretica* L., par l'application des techniques cytologiques, histochimiques et histoautoradiographiques, une étude cytophotométrique a été réalisée.

Cette étude a montré que la cellule apicale du méristème jeune parcourt un cycle diploïde normal au cours duquel la phase de postsynthèse, G2, est la plus longue. Pour les cellules des zones 2, 3 et 4, c'est au contraire la phase de présynthèse, G1, qui a la durée la plus importante. Dans la zone où se mettent en place les divers tissus de la tige, les noyaux sont arrêtés en phase G1; certains d'entre eux subissent une dernière synthèse d'ADN et poursuivent leur processus de différenciation alors qu'ils sont en phase G2 (contenu d'ADN égal à 4C).

Au niveau du méristème adulte, un certain nombre de noyaux contiennent une quantité d'ADN supérieure à 4C. Toutefois la fréquence des cellules polyploïdes diminue le long des deux gradients de dédifférenciation cytologique. La cellule apicale, par endoduplication, peut atteindre un niveau de polyploïdie égale à 16n. Ceci prouve que, dans un méristème adulte, l'apicale ne se divise plus régulièrement; elle perd le rôle histogène qu'elle possède à l'état jeune.

SUMMARY

Extending earlier studies (cytological, histochemical and autoradiographic) of the shoot apex, this investigation reports the cytophotometric analysis of DNA content in young and adult apical meristems of *Pteris cretica* L.

In the young meristem, the apical cell and its immediate derivatives (zone 1) have a normal diploid cycle in which the

phase following DNA synthesis, G_2 , is the longest. In contrast in zones 2, 3 and 4 the pre-synthesis phase, G_1 has the longest duration. In zone 5 where tissue differentiation begins the nuclei are arrested in the G_1 phase. However some nuclei may undergo a last synthesis of DNA and differentiate while they are in the G_2 phase and thus have a DNA content equal to 4 C.

In the adult meristem, some nuclei have a DNA content even higher than 4 C. However the frequency of polyploidy decreases along the two gradients of cytological dedifferentiation (zone 1 $\rightarrow$ 2; zone 1 $\rightarrow$ 4). Apical cell, by endoduplication can reach of DNA content of 16 C. Thus, in the adult meristem the apical cell no longer divides regularly; it loses the histogenetic function that it had in the young meristem.

INTRODUCTION

Les méristèmes caulinaires et radiculaires des Ptéridophytes se distinguent généralement de ceux des Végétaux supérieurs par la présence d'une cellule apicale particulière. Des travaux récents, effectués sur des espèces appartenant à divers groupes systématiques de Ptéridophytes [7, 8, 24, 27, 32, 34, 47, 48, 49, 50, 54, 55], ont de plus montré que les méristèmes apicaux de ces plantes possèdent des caractères histologiques, histo-chimiques et cytologiques communs qui confirment leur originalité par rapport aux méristèmes des Phanérogames : Gymnospermes [10] ou Angiospermes [38].

La structure des points végétatifs des Ptéridophytes ainsi que les particularités ultrastructurales et cytochimiques [32, 34] de leur cellule apicale, sont maintenant connues. Cependant, le fonctionnement de ces méristèmes et, par conséquent, le rôle exact joué par l'apicale, dans les plantes jeunes ou adultes, sont longtemps restés controversés et imprécis [7, 24, 47, 48, 50, 54, 55]. Récemment, la détermination des index mitotiques [34, 49], l'étude du métabolisme des acides nucléiques, par les méthodes histoautoradiographiques après incorporation de précurseurs spécifiques marqués au tritium [23, 34, 49], ont permis, en liaison avec les résultats cytologiques et cytochimiques, d'établir le fonctionnement de chacune des zones histologiques apicales, de saisir les rapports qui existent entre elles, mais aussi de formuler plusieurs hypothèses sur le rôle joué par la cellule apicale elle-même. Ainsi, chez le *Pteris cretica* L. [34], l'application de ces diverses techniques prouve que, dans le méristème caulinaire de la plante jeune, la cellule apicale possède déjà quelques caractères de cellule différenciée bien qu'elle synthétise de l'acide désoxyribonucléique (ADN) presque aussi fréquemment que ses voisines. Par contre, dans le méristème adulte, l'apicale acquiert de nombreux caractères de cellule différenciée; elle ne synthétise que très rarement de l'ADN et l'observation de figures de mitose y est tout à fait

exceptionnelle. Ces faits incitent à penser que, dans les méristèmes jeunes, la cellule apicale *possède une fonction histogénétique*. Cependant, le rôle de cette cellule dans le fonctionnement du méristème adulte reste tout à fait hypothétique. Deux éventualités peuvent être envisagées. On peut supposer, par exemple, que les synthèses d'ADN subies par l'apicale du méristème adulte sont régulières. Normalement suivies de mitose, elles sont difficiles à déceler par suite d'un cycle mitotique très lent. Dans ce cas, l'apicale du méristème adulte, comme celle du méristème jeune, conserve un véritable rôle histogène. Mais on peut aussi penser que les synthèses d'ADN décelées dans l'apicale adulte sont occasionnelles et non suivies de mitose; elles n'assurent plus qu'un renouvellement métabolique [42, 43] nécessaire à la survie de la cellule. L'apicale a alors perdu son rôle histogénétique.

Par des mesures cytophotométriques qui déterminent la quantité d'ADN présente dans un noyau, AVANZI et D'AMATO [1, 16] ont récemment montré que les apicales radiculaires de diverses Filicinées, ainsi que l'apicale caulinaire de l'*Equisetum arvense* [18], peuvent être « polyploïdes », car leur quantité d'ADN est supérieure à 4 C, c'est-à-dire à la quantité d'ADN d'un génome à 4 n. Ces résultats suggèrent une troisième hypothèse en ce qui concerne le fonctionnement de l'apicale : les synthèses d'ADN, décelables à son niveau, sont occasionnelles. Non suivies de mitose, *elles provoquent une endopolyploïdie*. Dans ce cas, l'apicale du méristème adulte, qui ne fournit pas des dérivées de façon régulière, ne possède plus de fonction histogénétique. Cependant, WARDLAW a montré qu'après suppression par piqure de la cellule apicale du *Dryopteris aristata* [54] par exemple, le méristème peut reformer une nouvelle apicale et reprendre alors son fonctionnement normal ou, au contraire, dégénérer si la blessure est trop importante. Ces résultats permettent de penser que la cellule apicale est indispensable au fonctionnement du méristème et joue un rôle dans sa régulation métabolique.

Une étude cytophotométrique a été effectuée afin de vérifier, d'une part, si dans les méristèmes jeunes les synthèses d'ADN, décelées dans l'apicale, sont bien les prémices de futures divisions et de préciser, d'autre part, si dans le méristème adulte ces synthèses peuvent traduire une endopolyploïdie. Les résultats de cette recherche doivent également nous aider à comprendre pourquoi, dans la zone où se mettent en place les différents tissus de la tige (ou zone 5), les pourcentages de noyaux marqués, après une incorporation de thymidine tritiée, sont beaucoup plus élevés que ne le laisse prévoir l'examen des index mitotiques, et ceci aussi bien dans le méristème jeune que dans le méristème adulte.

I. — LA MÉTHODE CYTOPHOTOMÉTRIQUE

A. — *Principe.*

Selon LISON [28], CASPERSSON fait faire à l'histochimie moderne un pas décisif en introduisant, il y a une trentaine d'années déjà, la méthode cytophotométrique. Cette méthode permet, en effet, d'exprimer de façon *quantitative* la coloration d'une préparation histologique.

Si, après avoir noté l'intensité lumineuse, I_0 , d'un faisceau donné de lumière monochromatique, on interpose dans ce faisceau un objet dont le « taux de coloration » est à mesurer, l'intensité, I , du faisceau, diminue de la quantité de lumière absorbée et devient I . La transmission, T , est égale à $\frac{I}{I_0}$.

La transmission, T , dépend au moins de deux facteurs : la concentration, c , de la substance colorée et l'épaisseur, d , de l'objet renfermant cette substance. On peut donc appliquer la loi de BEER-LAMBERT qui donne, en fonction de ces deux facteurs, une valeur de l'absorption exprimée par l'extinction, $E = kcd$ (dans laquelle k est un coefficient d'extinction) ; l'extinction étant liée à la transmission, T , par la formule $E = \log \frac{1}{T}$.

La mesure de la transmission, T , permet donc d'obtenir la valeur de la concentration de coloration, c . $c = \log \frac{1}{T} \times \frac{1}{kd}$ ou encore : $c = \frac{E}{kd}$.

La quantité de coloration, q , d'un objet est égale au produit du volume, v , de cet objet par la concentration, c , de la substance qui le colore : $q = cv$. Or le volume, v , de l'objet est égal au produit de sa surface, S , par son épaisseur, d ; $v = dS$ donc $q = cdS$. En remplaçant cette dernière expression c , par sa valeur on obtient : $q = \frac{E}{kd} dS$ et après simplification $q = \frac{1}{k} ES$.

Connaissant $\frac{1}{k}$, mesurant S et calculant E à partir des mesures effectuées, la quantité de coloration, q , peut être déterminée.

Certaines colorations peuvent être obtenues par une réaction histo-chimique. La réaction de FEULGEN met en évidence de façon spécifique l'ADN sur des sections histologiques. Une hydrolyse acide modérée sépare de l'ADN les bases puriques (adénine et guanine). La liaison glucosidique des purines avec le radical glucidique est rompue. Un tautomère à fonction aldéhydique est libéré. Le groupement aldéhydique, masqué auparavant, est responsable de la recoloration de la fuchsine basique décolorée par l'acide sulfureux ou réactif de SCHIFF. Si l'on admet qu'il existe une proportionnalité entre l'intensité de la coloration obtenue après la réaction de FEULGEN et la quantité d'ADN présente dans un noyau, on voit que les mesures cytophotométriques, effectuées sur des noyaux préalablement traités par la

réaction de FEULGEN, fournissent une évaluation de la quantité relative d'ADN qu'ils contiennent.

La méthode cytophotométrique, appliquée à une réaction histochimique aussi importante que celle qui détecte l'ADN, ouvrirait donc des voies nouvelles à l'histochimie en lui permettant, par exemple, de comparer *quantitativement* le contenu en ADN de plusieurs noyaux.

L'appareil utilisé pour ces mesures est un cytophotomètre. Son fonctionnement peut être rapidement décrit. L'objet à photométrer est délimité par un diaphragme qui épouse sa forme le mieux possible. Un faisceau de lumière monochromatique, provenant d'un monochromateur, passe à travers ce diaphragme, puis il est projeté sur une cellule photo-électrique à multiplicateur d'électrons. Le courant débité par cette cellule est mesuré à l'aide d'un galvanomètre. Pour chaque objet à mesurer, deux lectures sont effectuées. Pour la première mesure, le champ du diaphragme est vide et situé sur une partie blanche de la préparation. L'intensité, I_0 , du faisceau lumineux, provoque une déviation du galvanomètre que l'on règle sur 100 divisions. Pour la seconde mesure, l'objet est placé dans le champ du diaphragme. La déviation du galvanomètre que l'on obtient alors est une *valeur relative* : c'est, en %, la quantité de lumière transmise, T . A partir des formules $E = \log \frac{1}{T}$ et $q = \frac{1}{k} ES$, la quantité de coloration, q , proportionnelle à la quantité d'ADN, peut être évaluée.

B. — *Historique et critique de la méthode.*

Cette méthode, par son apparente facilité d'emploi, et par les résultats intéressants qu'elle était appelée à donner, a été rapidement et fréquemment utilisée. Les nombreuses recherches suscitées par la cytophotométrie, outre les résultats qu'elles ont apportés, ont peu à peu précisé les conditions optimales pour l'obtention de bonnes mesures, tout en définissant clairement les limites et les sources d'erreurs majeures de la technique.

Deux faits étaient importants à confirmer pour assurer la validité des mesures :

- 1° la spécificité de la réaction de FEULGEN pour l'ADN et,
- 2° la proportionnalité qui existe entre l'intensité de la coloration obtenue et la quantité d'ADN présente dans un noyau.

Dès 1948 [19, 20], les travaux de DI STEPHANO confirment ceux de BAUER effectués en 1932 (voir VENDRELY et VENDRELY [53]). Ils établissent la signification chimique de la réaction de FEULGEN. Le réactif de SCHIFF (fuchsine décolorée par SO_2) ne se recoloré qu'en présence des groupements aldéhydes libérés après l'hydrolyse acide qui sépare les bases puriques de la molécule d'ADN. Ce réactif peut colorer certains composants cytoplasmiques comme les polysaccharides ou les lipides. Mais, selon ces auteurs, si aucune coloration ne se développe sur des préparations témoins *qui n'ont*

pas subi d'hydrolyse, on peut être sûr que la coloration obtenue est bien due à la seule présence d'ADN.

D'autre part, en étudiant par cytophotométrie des noyaux dont la quantité d'ADN est préalablement déterminée au moyen de dosages chimiques, différents chercheurs prouvent, de 1950 à 1954 (voir VENDRELY et VENDRELY [53]), que l'intensité de la coloration obtenue après la réaction de FEULGEN, ne dépend que de la quantité plus ou moins importante d'ADN de ces noyaux.

Vers 1950, la méthode cytophotométrique arrive donc à point pour résoudre certains grands problèmes biologiques encore en suspens. En 1948, BOIVIN, VENDRELY et VENDRELY [3] avaient en effet montré, après isolement de noyaux et dosage de l'ADN qu'ils renferment, que les noyaux des cellules somatiques contenaient, sans doute, deux fois plus d'ADN que les noyaux des gamètes. Mais les techniques chimiques, qui fournissaient des quantités *absolues* d'ADN, ne donnaient que des valeurs moyennes. Seule la méthode cytophotométrique, qui mesure la quantité d'ADN contenue dans un noyau *préalablement choisi*, pouvait apporter des résultats précis et indiscutables. Cette méthode fut donc utilisée, d'ailleurs essentiellement sur du matériel animal (voir VENDRELY et VENDRELY [53]) et elle permit, en liaison avec les méthodes chimiques, de montrer :

1° que la quantité d'ADN présente dans les noyaux somatiques est à peu près constante et correspond bien au double de la quantité d'ADN du noyau d'un gamète;

2° qu'il existe une relation entre la quantité d'ADN présente dans un noyau et le nombre de chromosomes, ce qui prouve bien que la détermination de la quantité d'ADN permet de mesurer l'état de « ploïdie » d'un noyau;

3° que dans des cellules mitotiquement actives, la synthèse d'ADN qui précède la mitose s'effectue au milieu de l'interphase; enfin,

4° qu'il existe des variations dans la quantité d'ADN des noyaux de cellules différenciées.

En 1952, MOORE [36] interprète déjà ces variations comme indiquant une activité particulière et morphogène de certains gènes.

Jusqu'en 1950, les travaux effectués au moyen de la méthode cytophotométrique sur du matériel végétal sont peu nombreux. En 1949, SCHRADER et LEUCHTENBERGER [46] évaluent les quantités relatives d'ADN des noyaux du méristème racinaire, des feuilles et des bourgeons du *Tradescantia*. Leurs résultats montrent que la quantité d'ADN nucléaire varie selon les organes, ou même leurs différents tissus, et qu'elle n'est pas toujours un multiple exact de celle du noyau d'un gamète. En 1950, SWIFT [51] mesure à son tour les quantités d'ADN contenues dans les noyaux du méristème racinaire, de la coiffe et de l'endosperme du Blé et du *Tradescantia*. Il examine également les grains de pollen de ces deux genres. Il confirme les résultats de SCHRADER et LEUCHTENBERGER, mais note que les quantités

d'ADN déterminées *correspondent toujours* à un multiple exact de celles d'un gamète. Les variations de la quantité d'ADN traduisent donc une polyploïdie par rapport au contenu en ADN du noyau d'un gamète.

En 1961, Mc LEISH et SUNDERLAND [30] déterminent, par cytophotométrie, les quantités d'ADN contenues dans les noyaux des racines de dix espèces végétales différentes et les comparent aux quantités absolues moyennes d'ADN évaluées sur des racines de ces mêmes espèces par analyse chimique. Ils montrent que la cytophotométrie, applicable au domaine végétal, permet d'établir des comparaisons, d'une part sur les quantités d'ADN nucléaire, à l'intérieur d'une même espèce, et, d'autre part, sur le contenu en ADN des noyaux de différentes espèces, à condition d'exprimer les résultats sous forme de pourcentages. Cette technique est dès lors utilisée sur des matériels variés et dans le but de résoudre des problèmes bien particuliers. Elle s'avère aussitôt spécialement précieuse pour l'étude du problème de la polyploïdie.

En effet, en 1952, D'AMATO [14, 15] avait montré par une étude caryologique très précise que les cellules polyploïdes étaient très fréquentes dans les tissus différenciés des racines d'un certain nombre d'Angiospermes; par exemple : *Bellevalia romana*, *Muscari comosum*, *Tradescantia canaliculata*, *Scilla pratensis*. Afin de déclencher l'entrée en mitose des cellules différenciées, il immergeait les racines, durant trois jours ou plus avant leur fixation, dans une solution d'une substance de croissance, le 2,4-dichlorophénoxyacétate à une concentration de 10, 20 ou 50 mg/l. Les chromosomes pouvaient ainsi être comptés. Cette technique, difficile à mettre en œuvre, allait bientôt être supplantée par la méthode cytophotométrique qui témoigne plus aisément des phénomènes de polyploïdie sans intervention préalable sur les organes ou tissus étudiés. C'est ainsi que AVANZI et D'AMATO [1, 16] démontrèrent peu après que le contenu en ADN du noyau de l'apicale radiculaire de diverses Filicinées leptosporangiées, ainsi que celui du noyau de l'apicale caulinaire de l'*Equisetum arvense* [18], est très souvent supérieur à 4 C, donc que les apicales peuvent être polyploïdes.

De même, D'AMATO, DEVREUX et MUGNOZZA [17] établirent que le noyau végétatif des grains de pollen de l'Orge et du Tabac, d'abord évidemment haploïde, devient diploïde, avant même la croissance du tube pollinique. Par cette même technique, BRUNORI et D'AMATO [6] déterminèrent que les cellules de l'embryon contenu dans les graines sèches du *Pinus pinea* et du *Lactuca sativa* sont bloquées en phase de présynthèse G1. En reliant les résultats cytophotométriques, biochimiques et histoautoradiographiques avec les variations des volumes nucléaires au cours du cycle mitotique, RASCH, RASCH et WOODARD [44], sur les méristèmes radiculaires de *Vicia faba*, démontrèrent l'existence, en dehors du centre quiescent, de ce qu'ils nomment « a discreet population of quiescent cells », c'est-à-dire l'existence d'une « population de cellules quiescentes difficilement reconnaissables ».

Dans les travaux les plus récents, la cytophotométrie est toujours

utilisée en liaison avec les méthodes histoautoradiographiques, soit pour préciser la phase d'arrêt la plus longue au cours du cycle mitotique des cellules méristématiques radiculaires [11] ou caulinaires [25, 45], soit pour déterminer si les synthèses d'ADN, qui se produisent dans des cellules ne se divisant plus, provoquent une endopolyploïdie [4, 13, 26, 29] ou n'en produisent pas [42, 43].

Au cours de ces recherches, les techniques ont été progressivement précisées et affinées afin d'obtenir les mesures les plus reproductibles possibles. Effectuées tout d'abord sur du matériel soumis à un écrasement, les mesures furent ensuite réalisées sur des sections, ce qui permit de comparer le contenu relatif en ADN de noyaux appartenant à des zones précises d'un territoire étudié.

Cependant, tous les travaux précédemment cités reposent sur des mesures cytophotométriques obtenues à l'aide d'une seule longueur d'onde, la quantité d'ADN étant calculée à partir de la formule : $q = \frac{1}{k}$ ES. Or, les erreurs inhérentes au principe même de la cytophotométrie et à l'appareillage sont importantes. Selon PATAU [41], trois séries d'erreurs sont à considérer : l'erreur chimique, l'erreur due à la lumière parasite lors des mesures et l'erreur distributionnelle.

L'erreur chimique. — La proportionnalité qui existe entre la quantité d'ADN présente dans un noyau et l'intensité de la coloration de FEULGEN dépend du fixateur utilisé et du temps d'hydrolyse employé. Cependant, pour un même fixateur et pour un même temps d'hydrolyse, cette proportionnalité peut varier pour les noyaux appartenant à *divers échantillons* placés sur une *même lame*, mais aussi pour les noyaux d'un *même tissu* placés sur des *lames différentes*. Puisque le but de toute étude cytophotométrique est une comparaison entre plusieurs noyaux, il convient donc de tenir le plus grand compte des variations de proportionnalité qui pourraient exister, pour les conditions précitées, entre la quantité d'ADN d'un noyau et l'intensité de la coloration, ces variations déterminant une *erreur chimique*. Afin de l'éviter, les valeurs correspondant à 2 C et à 4 C (quantité d'ADN d'un génome à 2n ou à 4n) doivent être établies, *pour chaque préparation*, d'après les mesures obtenues pour des noyaux en mitose, respectivement en télophase (2 C) ou en métaphase par exemple (4 C).

L'erreur due à la lumière parasite. — C'est une erreur optique provoquée par la lumière parasite qui peut exister au voisinage de l'appareil lors des mesures. Cette erreur est une erreur par défaut. Afin de la supprimer, il convient de travailler dans une pièce obscure où la seule source de lumière est celle du microscope.

L'erreur distributionnelle. — C'est une erreur qui est due à la non-uniformité de la coloration au niveau de l'objet à mesurer. En effet, la formule utilisée pour déterminer la quantité de la coloration, $q = \frac{1}{k}$ ES, ne

s'applique qu'à un objet qui absorbe la lumière de façon homogène. Très peu d'objets d'intérêt histochimique sont *réellement* homogènes. Mais surtout, les noyaux n'ont pas une forme géométrique et de ce fait ils ne sont jamais parfaitement entourés par le diaphragme. Ainsi, existe-t-il toujours des « espaces », plus ou moins importants, entre l'objet biologique et les limites du diaphragme. *Le champ du diaphragme, qui est en fait photométré, n'a donc pas une coloration homogène.*

A l'aide de la formule, $q = \frac{1}{k} ES$, la quantité de coloration, q , est calculée comme si, au niveau de la surface photométrée, les molécules absorbantes étaient distribuées de manière uniforme. Comme elles ne sont pas réparties de façon homogène, ainsi que nous venons de le voir, la quantité de coloration calculée n'est donc pas égale à la quantité de coloration du noyau. L'erreur distributionnelle correspond à l'écart entre ces deux valeurs; et cet écart ne peut être estimé.

L'erreur distributionnelle est d'autant plus grande que l'objet biologique à mesurer est moins transparent. Elle peut être diminuée en employant, pour les mesures, une longueur d'onde pour laquelle l'objet est plus transparent, mais dans ce cas, l'extinction, E , ne peut être mesurée avec précision. C'est pourquoi ORNSTEIN [39] et PATAU [41] ont essayé, d'une autre manière, de diminuer l'importance de l'erreur distributionnelle dans le calcul de la quantité de coloration. Ils sont arrivés indépendamment, en 1952, à proposer une méthode particulière de mesure connue sous le nom de « méthode des deux longueurs d'onde ».

C. — *La méthode des deux longueurs d'onde.*

ORNSTEIN [39] et PATAU [41] ont cherché à substituer à la formule employée pour le calcul de la quantité de coloration, $q = \frac{1}{k} ES$, une formule meilleure qui tienne compte de l'erreur distributionnelle. Ainsi que nous l'avons vu plus haut, cette erreur est due à l'hétérogénéité du champ photométré. Le champ photométré peut être subdivisé en un certain nombre de parties (1 à n) d'homogénéité différente.

En première approximation ce nombre peut être 2 : d'une part, le noyau considéré artificiellement comme homogène et, d'autre part, l'espace compris entre le noyau et les limites du diaphragme. En effet, ORNSTEIN et PATAU ont montré que le développement mathématique de la loi de BEER-LAMBERT, appliqué au cas $n = 2$, apportait une correction considérable à l'expression des mesures.

La formule obtenue par ces deux auteurs, afin de calculer la quantité de coloration du champ photométré total, implique des mesures de transmission effectuées à deux longueurs d'onde différentes. Afin que cette formule reste aussi simple que possible, ces deux longueurs d'onde doivent

être choisies de telle sorte que $E(\lambda a) = 2 E(\lambda b)$. Cependant, l'utilisation de cette formule implique des calculs longs et fastidieux. Pour les éviter, MENDELSON [31 II] établit, en 1958, des tables qui donnent directement, en fonction des transmissions obtenues pour les deux longueurs d'onde utilisées, les valeurs de la quantité de coloration. Si l'on doit comparer les quantités de coloration de noyaux de dimensions très différentes, il suffit de multiplier la valeur obtenue, pour chaque noyau, par la surface du champ photométré. La méthode des deux longueurs d'onde, qui réduit donc au maximum l'erreur distributionnelle, comporte plusieurs autres avantages. Ainsi, elle ne nécessite pas de mesure de la surface de l'objet biologique, mais seulement une évaluation de la *surface du champ photométré*, c'est-à-dire de la surface comprise à l'intérieur du diaphragme utilisé. Elle compense, de plus, les erreurs dues à la réflexion et à la diffraction de la lumière. Néanmoins des exigences sont à satisfaire. La première est fondamentale puisque liée à la méthode : le champ photométré doit toujours comprendre une partie claire autour du noyau. Les autres exigences sont de nature technique : le champ photométré doit être éclairé de façon uniforme ce qui nécessite un éclairage de KOHLER; et la coloration de l'objet biologique ne doit être ni trop claire ni trop foncée. L'emploi de cette méthode, pour mesurer la quantité d'ADN contenue dans les noyaux d'un matériel donné, implique, de plus, deux opérations distinctes :

— d'une part, la construction de la courbe d'absorption de la coloration pour un matériel biologique donné, permettant la détermination des deux longueurs d'onde pour lesquelles $E(\lambda a) = 2 E(\lambda b)$;

— d'autre part, la réalisation des mesures proprement dites. Pour chaque noyau quatre mesures doivent être effectuées :

1° avec λa et le champ du diaphragme sur une partie blanche de la préparation;

2° avec λa et le champ du diaphragme contenant l'objet à mesurer;

3° avec λb et le champ du diaphragme sur une partie blanche de la préparation;

4° avec λb et le champ du diaphragme contenant l'objet.

En 1958, MENDELSON [31 I] a discuté de la validité de la méthode des deux longueurs d'onde. Il a démontré que les variations de la surface du champ du diaphragme contenant un même noyau, ainsi que les changements d'objectifs lors des mesures, n'altèrent pas les résultats. De plus, en utilisant des gouttes sphériques de colorant (Soudan bleu ou Soudan IV) dont le volume varie de 1 à 100, il a prouvé que la quantité de colorant estimée au niveau de ces gouttes, par la méthode cytophotométrique, est conforme aux volumes préalablement déterminés.

Cette méthode, qui rend les résultats cytophotométriques beaucoup plus sûrs, a été cependant fort peu employée, même dans les travaux récents. A notre connaissance, seuls HALLET [25, 26], LIST [29] et REMBUR [45] l'ont utilisée jusqu'ici.

D. — *Interprétation des résultats.*

Lorsque, par la méthode à une longueur d'onde ou mieux par celle à deux longueurs d'onde, la quantité relative d'ADN est déterminée pour une série de noyaux, les résultats obtenus doivent être interprétés.

Les données peuvent être présentées sous forme de tableaux, mais l'on peut aussi établir des histogrammes de fréquence distributionnelle qui fournissent, pour un matériel donné, le nombre de noyaux selon la quantité arbitraire d'ADN qu'ils contiennent (fig. 1). A partir de ces histogrammes, des pourcentages sont établis et des comparaisons sont effectuées entre différentes catégories nucléaires. Dans la majorité des cas, les mesures cytophotométriques servent à déterminer le degré de ploïdie atteint par un noyau. Il faut donc établir quelle est la valeur relative arbitraire, correspondant à 2 C ou à 4 C (quantité d'ADN d'un génome respectivement à $2n$ ou à $4n$). La manière de déterminer ces valeurs n'est expliquée avec beaucoup de détails dans aucune publication, elle varie d'ailleurs selon les auteurs et selon le matériel étudié.

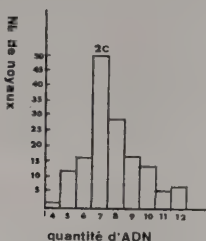


FIG. 1.

Histogramme présentant le nombre de noyaux, selon leur contenu en ADN en unités arbitraires, dans le centre quiescent du méristème raculaire du *Zea mays*, selon CLOWES [11].

Afin de compenser l'erreur chimique, CLOWES [11] tient compte, dans l'interprétation de ses mesures, et pour établir des comparaisons, des variations des valeurs 2 C et 4 C qui diffèrent d'une préparation à l'autre. Toutes les valeurs déterminées sur des noyaux en prophase ou en métaphase (4 C) ou bien sur des noyaux en télophase (2 C), appartenant à des préparations différentes, l'amènent à fixer une *valeur moyenne* pour 2 C et pour 4 C. En comparant, *pour chaque préparation*, la valeur 2 C, 4 C déterminée expérimentalement à la valeur *moyenne* 2 C ou 4 C, un coefficient, variable d'une préparation à l'autre, est établi. Pour chaque préparation, toutes les quantités arbitraires d'ADN déterminées sont multipliées par le coefficient spécifique. Par contre, D'AMATO [16], pour supprimer toute erreur chimique, dispose toutes les sections d'un méristème sur une *même lame*. Pour chaque lame, donc pour chaque méristème, il détermine les valeurs relatives, correspondant à 2 C et à 4 C, en mesurant les noyaux respectivement en télophase et en métaphase. Puis il compare les valeurs obtenues pour les autres noyaux à ces valeurs repères 2 C et 4 C.

II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUE

A. — *Matériel.*

Deux catégories de méristèmes sont étudiées : les méristèmes issus de jeunes sporophytes, qui ont construit au plus quatre ou cinq feuilles, et les méristèmes de plantes adultes.

1° Les méristèmes des jeunes sporophytes.

De faible dimension, ils sont prélevés sur des plantes obtenues par culture de spores sur milieu liquide, en conditions stériles [34]. Ces spores donnent des prothalles six semaines après leur ensemencement. Une fois la fécondation effectuée, les jeunes sporophytes deviennent visibles à l'œil nu après deux à trois semaines.

La planche I, figure a, présente une section longitudinale axiale d'un méristème ayant formé la feuille de rang n ($F_n = F_3$, feuille de rang 3). La cellule apicale, *ca*, déjà bien reconnaissable par sa taille, par sa forme et par son noyau volumineux mais peu colorable par le réactif de SCHIFF, est bordée par quelques grandes cellules prismatiques. Cet ensemble constitue la zone 1. Latéralement, de part et d'autre de la zone 1, des cellules plus petites, cubiques, au noyau plus chromatique et parmi lesquelles s'individualiseront les apicales foliaires, construisent la zone 2. Sous la zone 1, des cellules isodiamétriques, issues des recloisonnements périclines des voisines de l'apicale forment la zone 3. La zone 4, représentée seulement par quelques cellules allongées, associées en une sorte de zone en coquille, est analogue par son fonctionnement à un méristème médullaire. Mais cette zone fournit des cellules qui se différencieront en éléments vasculaires. Enfin, dans la zone 5, ou « zone de maturation » de WARDLAW [55], les divers tissus de la tige commencent à se mettre en place. Nos études cytologiques et histochimiques [34] ont montré l'existence d'un gradient de dédifférenciation depuis la cellule apicale jusqu'à la zone 2 et depuis l'apicale jusqu'aux cellules de la zone 4.

2° Les méristèmes de plantes adultes.

Très volumineux, ils occupent les extrémités aplaties de rhizomes plagiotropes. Ils sont prélevés sur des plantes cultivées dans des conditions favorables et contrôlées afin qu'une croissance active soit maintenue (température $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$; humidité 80 %; énergie lumineuse : $8 \cdot 10^4 \text{ ergs/cm}^2/\text{s}$, fournie durant douze heures par des tubes fluorescents type lumière du jour

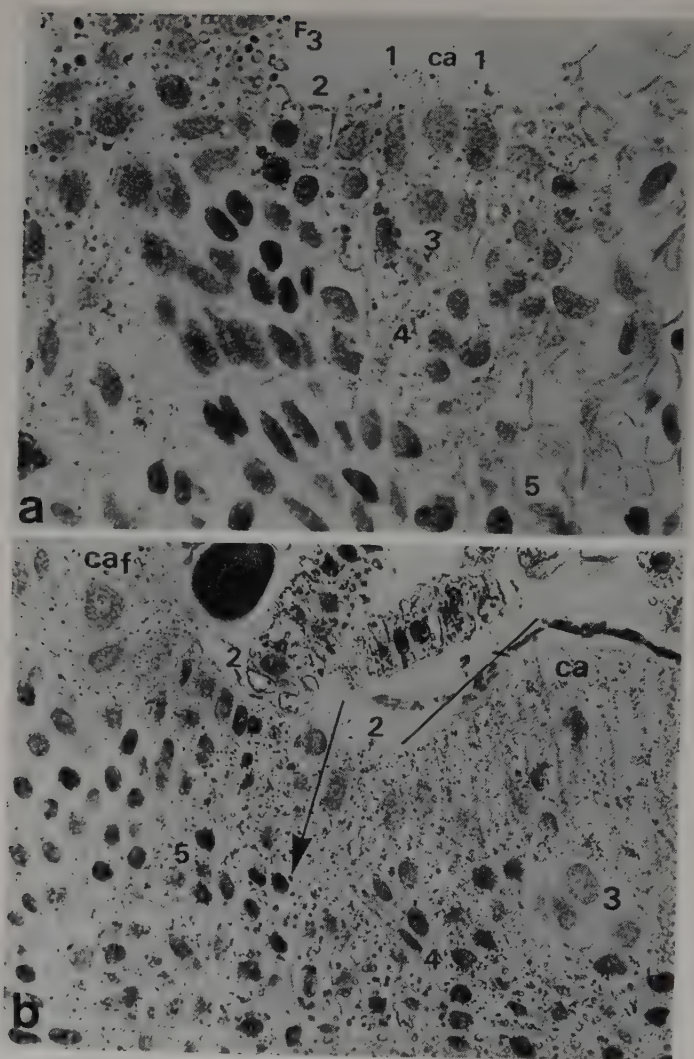


PLANCHE I

FIG. a. — Section longitudinale axiale du méristème apical d'un jeune sporophyte traité par la réaction de FEULGEN.

ca : cellule apicale; F3 : feuille de rang 3; 1, 2, 3, 4 et 5, les cinq zones histologiques du méristème.

HELLY. Réactif de SCHIFF. (G. $\times$ 660.)

FIG. b. — Section longitudinale axiale du méristème apical adulte traité par la réaction de FEULGEN.

ca : cellule apicale; caf : cellule apicale foliaire; 1, 2, 3, 4 et 5, les cinq zones histologiques du méristème. Noter les composés phénoliques qui encombrant les cellules (flèches).

HELLY. Réactif de SCHIFF. (G. $\times$ 370.)

à émission continue sur toute la longueur du spectre avec appoint d'énergie dans le rouge orangé).

La figure b de la planche 1 présente une section longitudinale axiale du méristème apical adulte du *Pteris cretica* L. Les cinq zones histologiques apicales décelées dans le méristème jeune, se reconnaissent aisément, mais elles sont constituées par un nombre de cellules beaucoup plus élevé. Des études cytologiques et histochimiques [32, 34] ont montré que ce méristème, bien plus structuré qu'il ne l'est à l'état jeune, présente toujours cependant les deux mêmes gradients de différenciation cytologique.

Afin d'obtenir des valeurs relatives d'ADN aisément comparables, ces deux séries de méristèmes sont techniquement traitées de la façon la plus homogène possible. Nous avons vu qu'après la réaction de FEULGEN, l'intensité de la coloration dépend du fixateur utilisé, du temps de l'hydrolyse acide ainsi que de celui de l'action du réactif de SCHIFF. Différents essais ont permis de fixer, pour le matériel étudié, les conditions techniques optimales pour les mesures cytophotométriques.

B. — Préparation des méristèmes pour les mesures cytophotométriques.

1° Fixation des échantillons et obtention des sections.

Plusieurs fixateurs peuvent être utilisés avant la réaction de FEULGEN.

— Le mélange de Helly est constitué par deux solutions :

Solution A	{	Chlorure mercurique	5 g
		Bichromate de potassium	2,5 g
		Sulfate de sodium neutre	1 g
		Eau distillée	100 ml
Solution B		Formol neutre à 35/40 %.	

que l'on mélange au moment de l'emploi, à raison de 9 volumes de A pour 1 volume de B.

— Le *craf II* préserve bien les structures cytologiques et conserve parfaitement la turgescence des cellules apicales. Sa composition est la suivante :

Acide chromique à 15 %	20 vol.
Acide acétique à 10 %	10 vol.
Formol neutre à 40 %	5 vol.
Eau distillée	65 vol.

Cependant, les cations métalliques (mercure, chrome) qui entrent dans la constitution de ces fixateurs peuvent, en se combinant avec des groupements ionisables (carboxyl ou phosphoryl), altérer les charges électrostatiques des complexes nucléoprotéiniques. Pour ne pas avoir à tenir compte

de ces phénomènes dont les conséquences sont difficiles à apprécier, surtout pour des mesures cytophotométriques, beaucoup d'auteurs préfèrent des fixateurs de composition plus simple qui ne renferment pas de cations métalliques [52], par exemple, l'alcool acétique, l'alcool éthylique ou le formol neutre. L'alcool acétique provoque un gonflement des noyaux, l'alcool éthylique les contracte au contraire. Ces deux fixateurs ont donc été éliminés puisqu'ils sont peu favorables à l'appréciation des volumes nucléaires. Par contre, le formol neutre à 10 % n'altère pas les dimensions nucléaires. De plus, il élimine des sections les composés phénoliques qui encombrant les cellules des méristèmes adultes et jeunes et qui peuvent gêner les mesures, lorsqu'ils sont localisés autour du noyau. Pour ces raisons, nous avons choisi de fixer nos échantillons au formol neutre.

Après un temps de fixation de 24 heures, les échantillons sont lavés à l'eau courante durant 24 heures également. Ils sont ensuite déshydratés puis inclus de façon habituelle dans de la paraffine de point de fusion 60-62° C.

Des essais d'hydrolyse puis de coloration en masse ont été réalisés. Cette méthode s'avère excellente pour de très petits échantillons; elle aurait pu être employée pour l'étude des jeunes méristèmes. Cependant, pour les plantes adultes, dont les méristèmes sont beaucoup plus volumineux, des difficultés de pénétration conduisent à une coloration non homogène. De ce fait, tous les échantillons ont dû être, pour les mesures, sectionnés avant l'hydrolyse.

Pour obtenir des sections contenant des noyaux entiers, l'épaisseur de la coupe est calculée en fonction de la dimension des noyaux à mesurer, mais aussi en tenant compte, selon les zones, des volumes respectifs du noyau et du cytoplasme. Pour que la section contienne un grand nombre de noyaux entiers, son épaisseur doit être plus importante que le diamètre

TABLEAU I. — VALEURS MOYENNES EN μ , DU DIAMÈTRE, D, DES NOYAUX DES ZONES 2, 3 ET 5 DES MÉRISTÈMES JEUNES ET ADULTES, DÉTERMINÉES SUR DES SECTIONS LONGITUDINALES AXIALES ET VALEURS MOYENNES EN μ DE L'ÉPAISSEUR, Ep, DES NOYAUX ALLONGÉS DES ZONES 1 ET 4 DES MÉRISTÈMES JEUNES ET ADULTES, ESTIMÉES SUR DES SECTIONS TRANSVERSALES. Les mensurations ont été effectuées sur cinq méristèmes traités par le réactif de SCHIFF; elles ont porté, pour chaque section, sur l'ensemble des noyaux.

	ZONE 1		ZONE 2	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	cellule apicale	dérivées de l'apicale				
	Ep	Ep	D	D	Ep	D
Méristème jeune	8	5,9	7,2	6,9	5	6,6
Méristème adulte	8,5	7,8	10,1	12,2	5	9,3

réal des noyaux. Mais pour éviter que trop de noyaux ne soient superposés, cette épaisseur ne doit pas atteindre le double du diamètre nucléaire.

Le tableau I présente les diamètres moyens, D, des noyaux arrondis des zones 2, 3 et 5, ainsi que l'épaisseur, Ep, des noyaux allongés des zones 1 et 4 des méristèmes adultes et jeunes. D'après ces mesures, pour obtenir un maximum de noyaux entiers, les sections des méristèmes jeunes doivent avoir 10 μ au moins d'épaisseur, celles des méristèmes adultes, au moins 15 μ . Certains méristèmes adultes sectionnés à 12 μ d'épaisseur ont été seulement utilisés pour des mesures concernant les noyaux des apicales [33].

2° Hydrolyse et coloration.

Pour que la coloration des sections ne soit ni trop claire ni trop foncée, les temps d'hydrolyse, puis ceux de coloration par le réactif de SCHIFF ont été déterminés. Les sections déparaffinées sont traitées par une solution normale d'acide chlorhydrique (soit 82,5 ml d'HCl, densité 1,19 pour 1 litre) à une température constante de 60° C, pendant 10 minutes. L'hydrolyse est arrêtée par passage brusque dans l'eau distillée froide. Les préparations sont ensuite plongées durant 1 h 30 dans le réactif de SCHIFF (LISON [28]). Les sections sont lavées dans trois bains de deux minutes chacun, dont la composition est fournie ci-dessous :

Bisulfite de sodium à 10 %	10 ml.
Eau de source	200 ml.
Solution normale d'acide chlorhydrique	10 ml.

Les sections déshydratées sont enfin montées au baume du Canada.

C. — Mesures cytophotométriques.

Sur les sections ainsi préparées, l'intensité de la coloration des noyaux est mesurée à l'aide d'un cytophotomètre Leitz MPV. L'utilisation de la méthode des deux longueurs d'onde de PATAU [41], décrite p. 156, nécessite tout d'abord, pour chaque matériel traité dans des conditions techniques données, la détermination des deux longueurs d'onde avec lesquelles seront effectuées les mesures.

1° Détermination des deux longueurs d'onde.

Sur une des sections traitées par la réaction de FEULGEN, un noyau est préalablement choisi. On note les différentes valeurs de transmission, obtenues pour la coloration de ce noyau en faisant varier la longueur d'onde de 460 à 650 nanomètres. L'extinction, E, étant égale à $\log \frac{1}{T}$, la courbe de l'extinction E, de ce noyau, en fonction de la longueur d'onde, λ , peut être

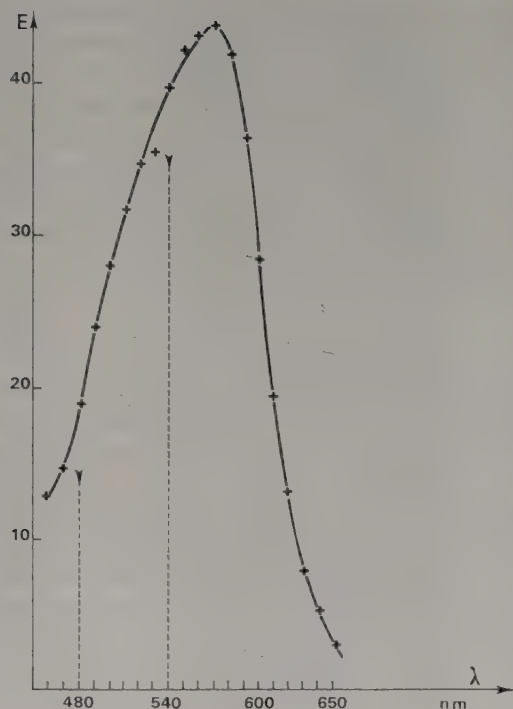


FIG. 2.

Courbes de l'extinction E ($E = \log \frac{1}{T}$) d'un noyau en fonction de la longueur d'onde λ , permettant de déterminer les deux longueurs d'onde (flèches) pour lesquelles on aura $E(\lambda a) = 2 E(\lambda b)$.

construite. La figure 2 qui présente cette courbe, permet de déterminer les deux longueurs d'onde a et b pour lesquelles $E(\lambda a) = 2 E(\lambda b)$, soit respectivement 540 et 480 nanomètres.

2° Mesures.

Dans chacune des cinq zones histologiques, les noyaux des sections longitudinales axiales, bien distincts et qui ne se chevauchent pas, en mitose ou non, sont photométrés. Cinquante sections de méristèmes jeunes et cinquante sections de méristèmes provenant de plantes adultes sont étudiées.

Pour chaque noyau, deux lectures sont faites à chacune des deux longueurs d'onde (une lecture pour laquelle le champ du diaphragme est un blanc, une seconde lecture pour laquelle le champ du diaphragme contient le noyau à mesurer). A partir des deux transmissions obtenues, les tables de MENDELSON [31 II] donnent directement la quantité de coloration qui est proportionnelle à la quantité d'ADN. Afin de tenir compte des dimensions très différentes des noyaux dans les méristèmes étudiés, chaque valeur donnée par les tables est multipliée par la surface du champ photométré.

3° *Interprétation des résultats.*

Lorsque les quantités d'ADN sont déterminées, des histogrammes, présentant le nombre de noyaux selon la quantité d'ADN qu'ils contiennent, ou *histogrammes de fréquence distributionnelle*, sont établis. De tels histogrammes sont réalisés pour chaque méristème.

Les valeurs relatives d'ADN correspondant à 2 C ou à 4 C sont évaluées à partir des noyaux en mitose. Afin d'éviter toute erreur, les valeurs 2 C, 4 C sont établies, selon la méthode de D'AMATO [16], pour chaque préparation, donc pour chaque méristème. Les valeurs obtenues pour les autres noyaux s'expriment alors en fonction de ces deux « valeurs repères » (fig. 3).



FIG. 3. — Exemple d'un histogramme de fréquence distributionnelle établi à partir des mesures effectuées sur les noyaux des cinq zones histologiques d'un méristème apical adulte traité par la réaction de FEULGEN. Les valeurs correspondant à 2 C (3,01) et à 4 C (6,82) sont déterminées à partir de mesures effectuées sur des noyaux en mitose et, à partir d'elles, les valeurs correspondant à 8 C et à 16 C sont calculées. Chaque case représente un noyau et le chiffre inscrit à son intérieur indique la zone histologique à laquelle il appartient. *ca*, cellule apicale.

III. — RÉSULTATS

A. — *Le méristème jeune.*1° *Contenu en ADN des zones 1 à 4.*

Lorsque les mesures cytophotométriques sont effectuées sur les noyaux des cinquante sections longitudinales axiales comparables à celle présentée par la planche I, figure a, l'examen des histogrammes établis pour chaque méristème (voir pour exemple la figure 3), permet le calcul, au niveau de chaque zone histologique, des pourcentages de noyaux selon la quantité

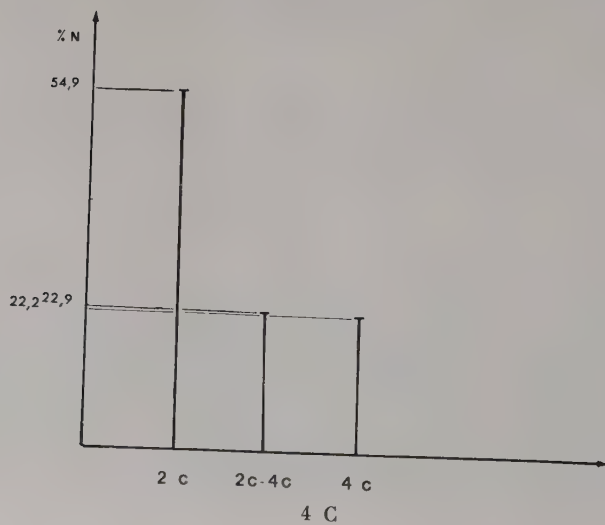
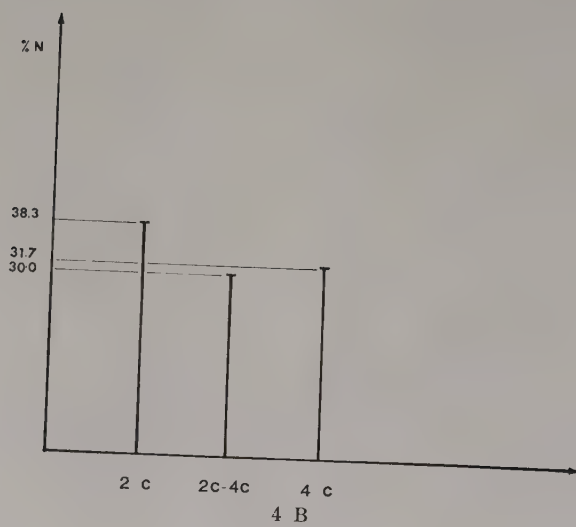
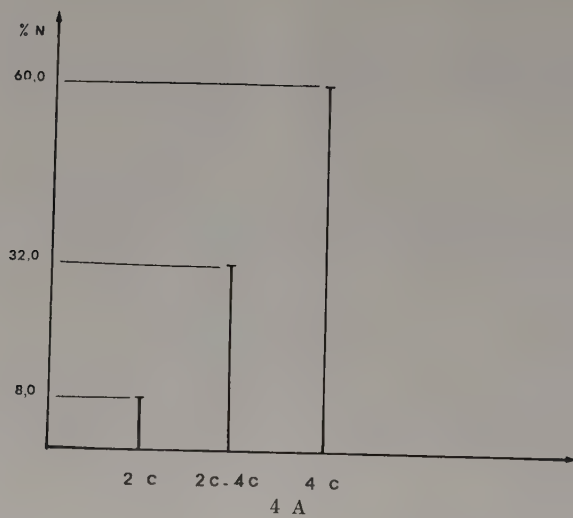
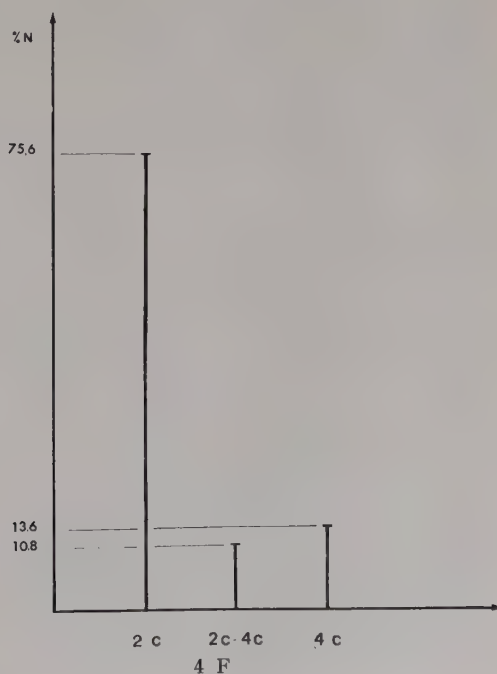
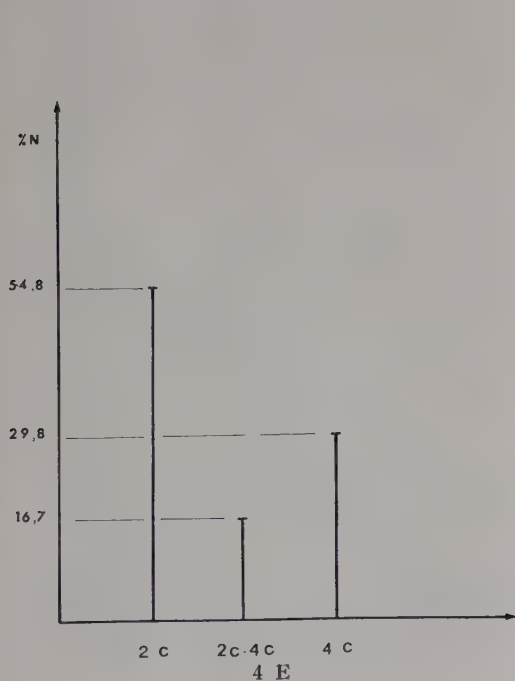
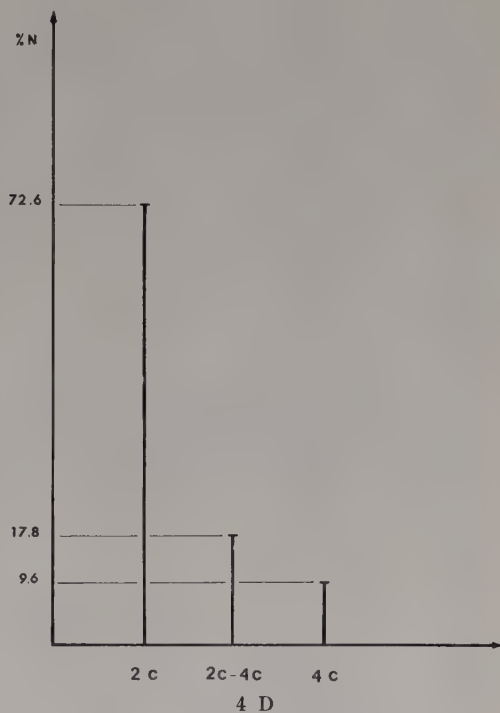


FIG. 4.

Histogrammes donnant, en pourcentage de noyaux, les teneurs en ADN des noyaux des cellules apicales (A) et des cellules des zones 1 à 5 (B à F), dans les méristèmes jeunes. Mesures effectuées sur cinquante méristèmes. Noter le pourcentage élevé de noyaux contenant une quantité d'ADN égale à 4 C au niveau des apicales, alors que dans les zones 2 (C), 3 (D), 4 (E) et 5 (F), ce sont les pourcentages de noyaux à contenu 2 C qui sont les plus importants. Au niveau de la zone 1 (B) les pourcentages de noyaux possédant une quantité d'ADN égale à 2 C et 4 C sont très voisins.



d'ADN qu'ils renferment. Le tableau II donne ces différents pourcentages pour les cinq zones apicales. Dans ces zones, aucun noyau ne contient une quantité d'ADN supérieure à 4 C. Cela signifie que, dans les méristèmes jeunes, toutes les cellules ont un cycle diploïde normal. *Aucune tendance à la polyploïdisation n'est décelable.* Les cellules dont le noyau possède une quantité d'ADN égale à 2 C sont en fin de mitose ou en phase de présynthèse, G1. Les cellules dont les noyaux ont un contenu d'ADN compris entre 2 C et 4 C sont en cours de synthèse; enfin, les cellules dont les noyaux ont un contenu d'ADN égal à 4 C sont en phase de postsynthèse G2, ou en début de mitose.

TABLEAU II. — POURCENTAGES DE NOYAUX DANS LES DIVERSES ZONES DU MÉRISTÈME JEUNE, SELON LA QUANTITÉ D'ADN (2 C, 2 C - 4 C, 4 C) QU'ILS RENFERMENT. Mesures effectuées sur les noyaux de cinquante sections longitudinales axiales de méristèmes traitées par la réaction de FEULGEN, soit : 50 noyaux de cellules apicales; 124 noyaux de cellules dérivées de l'apicale; 316 noyaux de la zone 2; 119 noyaux de cellules de la zone 3; 108 noyaux de cellules de la zone 4, et 248 noyaux de cellules de la zone 5.

	ZONE 1		ZONE 2	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	cellule apicale	dérivées de l'apicale				
2 C	8	38,3	54,9	72,6	54,2	75,6
2 C - 4 C	32	30	22,9	17,8	16,7	10,8
4 C	60	31,7	22,2	9,6	29,1	13,6

Les histogrammes de la figure 4 A à 4 F, présentent respectivement au niveau des apicales (A), de leurs dérivées (B) et des zones 2 à 5 (C à F), le pourcentage de noyaux selon leur contenu en ADN, 2 C, 2 C - 4 C et 4 C.

La figure 4 A met en évidence l'importance du pourcentage de cellules apicales qui possèdent une quantité d'ADN égale à 4 C. Au moment de la fixation, 60 % des apicales étaient en phase G2. *Ces résultats permettent de conclure que la phase la plus longue au cours du cycle des apicales est la phase de postsynthèse G2.*

Dans les zones 2, 3 et 4 (fig. 4 C à 4 E), les pourcentages de noyaux qui possèdent une quantité d'ADN égale à 2 C sont au contraire les plus élevés. *La phase G1 est donc la période la plus longue du cycle mitotique pour les cellules des zones 2, 3 et 4.* Au niveau de la zone 1, dans les dérivées de l'apicale (voir fig. 4 B), les pourcentages de noyaux à 2 C et à 4 C sont par contre très voisins. Aucune phase du cycle de ces cellules n'est donc préférentiellement plus longue.

Ces résultats confirment ceux obtenus par les méthodes histoautoradiographiques et par la détermination des index mitotiques [33]. Comme toutes les autres cellules du méristème, la cellule apicale possède un cycle diploïde normal au cours duquel elle se divise en donnant des dérivées. Mais la méthode cytophotométrique précise que l'apicale, par sa phase d'arrêt la plus longue en G2, se distingue des autres cellules méristématiques dont le stade d'arrêt le plus long est, au contraire, en phase G1.

Il est à remarquer que les dérivées de l'apicale qui présentent un état cytologique intermédiaire entre l'apicale elle-même et les cellules de la zone 2, possèdent d'après les pourcentages de noyaux à 2 C ou à 4 C (voir tableau II), *des phases G1 et G2 de durées sensiblement équivalentes*. Le long du gradient de différenciation cytologique réalisé entre l'apicale et la zone 2, la phase G2 est donc tout d'abord plus longue que la phase G1, dans l'apicale, puis, au niveau des dérivées de l'apicale, la phase G2 diminue et devient à peu près égale à la durée de la phase G1; enfin, dans la zone 2, la durée de la phase G2 diminue de telle sorte que *c'est G1* qui est alors la phase *la plus longue*.

2° Caractéristiques de la zone 5.

Dans la zone 5, où débute la différenciation cellulaire, des travaux antérieurs [34] ont montré que l'index mitotique est très faible (1,5 %) alors que le pourcentage de noyaux marqués, après une incorporation de thymidine tritiée durant quatre heures, est nettement plus élevé (11,8 %). Ces synthèses, non suivies de mitose pour la plupart, peuvent donner lieu à deux interprétations différentes [34]. On peut admettre qu'il s'agit de synthèses répétées provoquant une endopolyploïdie ou, au contraire, penser qu'il se fait une dernière synthèse d'ADN avant la phase finale de différenciation, qui s'effectuerait alors *en phase G2*.

Les résultats cytophotométriques obtenus pour la zone 5 montrent (tableau II) qu'aucun noyau ne possède une quantité d'ADN supérieure à 4 C. *Aucune polyploïdie n'est donc décelable dans cette zone*. De plus, le pourcentage de noyaux venant de subir une synthèse d'ADN et qui possèdent donc une quantité d'ADN égale à 4 C est faible si on le compare à celui des noyaux à 2 C (voir tableau II et fig. 4 F). Or la thymidine, comme tous les précurseurs d'acides nucléiques, peut provoquer de nouvelles synthèses d'ADN dans les cellules différenciées. Afin de vérifier si les synthèses, décelées par histoautoradiographie, ne sont pas induites, dans ces cellules en cours de différenciation, par le traitement à la thymidine tritiée et afin de voir si elles traduisent bien un *métabolisme normal*, des mesures cytophotométriques ont été effectuées sur des échantillons qui ont subi le traitement ci-dessous.

Des méristèmes sont soumis à une incorporation de thymidine tritiée

($0,25 \times 10^{-6}\text{M}$, c'est-à-dire 0,06 g/l; activité spécifique 4 Ci/mM, concentration 30 $\mu\text{Ci/ml}$) durant quatre heures. Après un lavage à l'eau courante, ils sont fixés au formol neutre, durant vingt-quatre heures, puis lavés et inclus de manière habituelle. Les sections, de 10 μ d'épaisseur, sont traitées par la réaction de FEULGEN dans les mêmes conditions techniques que celles décrites page 162. L'intensité de la coloration des noyaux est mesurée.

Si la thymidine tritiée induit bien effectivement de nouvelles synthèses, la zone 5 de ces échantillons de contrôle doit posséder des noyaux polyploïdes (quantité d'ADN supérieure à 4 C) ou bien montrer des pourcentages élevés de noyaux à 4 C.

Le tableau III permet la comparaison des pourcentages de noyaux qui possèdent une quantité d'ADN égale à 2 C, 2 C-4 C et 4 C, obtenus à partir des méristèmes traités et de ceux non traités par la thymidine tritiée. Les résultats, tout à fait comparables, prouvent que la thymidine tritiée appliquée pendant quatre heures et à la concentration de 0,06 g/l n'induit pas de nouvelles synthèses dans les cellules différenciées. *Les synthèses décelées par histautoradiographie dans la zone 5 traduisent donc bien le métabolisme normal de cette zone.*

TABLEAU III. — COMPARAISON DES CONTENUS EN ADN (2 C, 2 C-4 C, 4 C), APRÈS LA RÉACTION DE FEULGEN, DES NOYAUX DE LA ZONE 5 DES MÉRISTÈMES JEUNES (F) N'AYANT PAS INCORPORÉ DE TRACEUR ET DE MÉRISTÈMES JEUNES (TF) AYANT INCORPORÉ DE LA THYMINES TRITIÉE DURANT 4 HEURES AVANT LEUR FIXATION. Pourcentages calculés à partir de mesures effectuées sur les noyaux de cinquante sections longitudinales axiales, soit 248 noyaux pour la série F et 220 noyaux pour la série TF.

	F	TF
2 C	75,6	79,4
2 C-4 C.....	10,8	8,7
4 C	13,6	11,9

De l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que les cellules de la zone 5 commencent leur différenciation alors qu'elles *sont arrêtées en phase G1*, ce qui explique le pourcentage élevé de noyaux possédant une quantité d'ADN égale à 2 C. Les marquages décelés dans la zone 5, après histautoradiographie, prouvent que les cellules subissent une dernière synthèse d'ADN et terminent leur différenciation, alors qu'elles sont en phase G2. Ces cellules qui ne se divisent plus sont donc potentiellement « polyploïdes ».

Le faible pourcentage de noyaux marqués dans cette zone peut provenir de deux évolutions différentes. On peut envisager :

1° que certains noyaux seulement, et en faible nombre, subissent une dernière synthèse d'ADN pendant la différenciation cellulaire et ceci au niveau de la zone 5, ou bien,

2° que tous les noyaux subissent une dernière synthèse d'ADN, mais que celle-ci se produit à *n'importe quel moment* de leur différenciation et souvent bien au-delà de la zone 5.

3° Signification des valeurs 2 C - 4 C.

Les pourcentages de noyaux qui possèdent une quantité d'ADN intermédiaire entre 2 C et 4 C révèlent les pourcentages de noyaux qui étaient en phase de synthèse au moment de la fixation. De même, après une incorporation de thymidine tritiée de quatre heures, l'on obtient un certain pourcentage de noyaux marqués dans chaque zone histologique. Ces noyaux étaient en phase de synthèse lors de l'incorporation. Le tableau IV permet la comparaison des séries de valeurs fournies par cytophotométrie et par histautoradiographie. On voit que les pourcentages de noyaux 2 C - 4 C et de noyaux marqués ne sont pas identiques. La méthode cytophotométrique conduit à des valeurs beaucoup plus élevées.

Les pourcentages de noyaux 2 C - 4 C évalués par les mesures cytophotométriques sont nettement surestimés. En effet, comme nous l'avons vu, seules les valeurs 2 C et 4 C sont déterminées par l'expérimentation. *Les valeurs intermédiaires réelles* sont augmentées des valeurs 2 C, estimées par excès, et des valeurs 4 C estimées par défaut. Au contraire, les pourcentages de noyaux *en synthèse* déterminés après un flash sont plutôt sous-estimés. En effet, le temps nécessaire aux cellules pour absorber un précurseur marqué, pour incorporer ce précurseur à l'intérieur des nucléotides et pour synthétiser de l'ADN à partir de ces nucléotides, devient un facteur très important dans l'estimation des synthèses réellement effectuées, lorsque l'application du traceur est de très courte durée. Mais de plus, la thymidine, qui n'est pas un précurseur direct de l'ADN [43], ne peut entrer, sous cette forme, dans la voie normale du métabolisme de l'acide nucléique. La thymidine ne peut être incorporée à l'ADN que lorsqu'elle a été, par phosphorylation, transformée en un précurseur naturel : l'acide thymidilique. Pour ces raisons, seule une fraction des noyaux *réellement en synthèse* lors du flash est, vraisemblablement, effectivement marquée. De plus, les pourcentages de noyaux marqués obtenus après une incorporation durant un temps donné, indiquent *une durée relative* plus ou moins rapide du cycle mitotique dans les différentes zones apicales. Seuls des pourcentages calculés après une incorporation *la plus brève possible* peuvent fournir la valeur de la durée de synthèse, par rapport à la durée totale du cycle (T). En effet, selon MONTEZUMA DE CARVALHO [35], lorsque dans une « population » de cellules

asynchrones, la durée totale, T, du cycle mitotique est connue, la fraction du cycle (en %) durant laquelle une cellule synthétise de l'ADN, donc la durée de la phase S, est égale au pourcentage de cellules qui synthétisent de l'ADN durant une période minimale de traitement avec le radio-isotope.

Mais, pour notre matériel, les difficultés de pénétration de la thymidine tritiée, ou bien les modalités de son incorporation, sont telles qu'un temps de contact avec le traceur de durée inférieure à quatre heures donne des pourcentages de noyaux marqués beaucoup plus faibles que ceux obtenus après quatre heures. Ainsi s'explique la discordance des séries de valeurs enregistrées par les deux techniques.

D'ailleurs, des résultats voisins et d'interprétation aussi difficile ont été signalés par CLOWES [11] dans son étude du centre quiescent de la racine du *Zea mays*. Le pourcentage de noyaux marqués (5 %), donc en phase de synthèse après un flash bref, est nettement inférieur à celui évalué par l'étude cytophotométrique pour les noyaux qui possèdent une quantité d'ADN intermédiaire entre 2 C et 4 C (43 %). CLOWES [11] explique cette différence en faisant intervenir un blocage possible de certaines cellules du centre quiescent durant leur phase de synthèse.

Il faut cependant noter que les pourcentages de noyaux 2 C - 4 C, obtenus par cytophotométrie (tableau IV) diminuent le long des gradients de dédifférenciation. Si la méthode cytophotométrique s'avérait plus exacte

TABLEAU IV. — COMPARAISON, POUR CHACUNE DES ZONES APICALES, DES POURCENTAGES DE NOYAUX POSSÉDANT UNE QUANTITÉ D'ADN INTERMÉDIAIRE ENTRE 2 C ET 4 C (estimés par cytophotométrie), DONC EN SYNTHÈSE, ET DES POURCENTAGES DE NOYAUX MARQUÉS (déterminés par histoautoradiographie) APRÈS UNE INCORPORATION DE THYMINES TRITIÉES DURANT 4 HEURES.

	ZONE 1		ZONE 2	ZONE 3	ZONE 4	ZONE 5
	cellule apicale	dérivées de l'apicale				
2 C - 4 C	32	30	22,9	17,8	16,7	10,8
% de noyaux marqués après 4 heures d'incorporation	10	12,38	14,28	13,75	11,32	11,25

pour déterminer la durée de la phase de synthèse que le marquage bref (« flash labelling »), ces variations de pourcentages indiqueraient que la durée de S par rapport à la durée du cycle total (T) diminue, lorsque le cycle mitotique devient plus court. La durée de S ne serait donc pas constante pour toutes les cellules du méristème ainsi que certains auteurs l'avaient tout d'abord pensé [11].

B. — Le méristème adulte.

1° Expression des résultats.

Après avoir effectué des mesures cytophotométriques sur les noyaux de cinquante sections longitudinales axiales, comparables à celle présentée par la planche I, figure b, les diagrammes, établis pour chaque méristème (voir fig. 3), permettent de calculer, dans chaque zone histologique, le pourcentage de noyaux selon leur contenu en ADN. Les valeurs d'ADN qui correspondent à des quantités égales à 2 C ou à 4 C sont seules déterminées par l'expérimentation, et les valeurs 8 C ou 16 C, calculées à partir d'elles, sont approximatives.

Les pourcentages de noyaux qui possèdent une quantité d'ADN intermédiaire entre 2 C - 4 C, mais à plus forte raison entre 4 C - 8 C et 8 C - 16 C, entachés d'une erreur importante et inconnue, nous ont semblé sans intérêt. C'est pourquoi, seuls les pourcentages de noyaux ayant atteint un certain degré de ploïdie (2 C, 4 C) ou de polyploïdie (8 C, 16 C) ont été retenus.

2° Répartition de la polyploïdie dans le méristème.

Le tableau V présente le pourcentage de noyaux, selon leur contenu en ADN, dans les diverses zones du méristème adulte. On voit que, dans *chaque zone histologique*, un certain pourcentage de noyaux possèdent une quantité d'ADN supérieure à 4 C. Ces noyaux sont donc polyploïdes. Ils ont

TABLEAU V. — POURCENTAGES DE NOYAUX DANS LES QUATRE ZONES HISTOLOGIQUES DES MÉRISTÈMES APICAUX ADULTES, SELON LA QUANTITÉ D'ADN (2 C, 4 C, 8 C, 16 C) QU'ILS RENFERMENT. Mesures effectuées sur les noyaux de cinquante sections longitudinales axiales de méristèmes traités par la réaction de FEULGEN, soit 50 noyaux de cellules apicales; 248 noyaux de cellules dérivées de l'apicale; 440 noyaux de cellules de la zone 2; 230 noyaux de cellules de la zone 3, et 159 noyaux de cellules de la zone 4.

	ZONE 1		ZONE 2	ZONE 3	ZONE 4
	cellule apicale	dérivées de l'apicale			
2 C	20	36,1	44,5	38,2	39,6
4 C	40	46	46,6	47,3	50
8 C	35	16,2	7,3	10,9	6,2
16 C	5	1,7	1,6	3,6	4,2

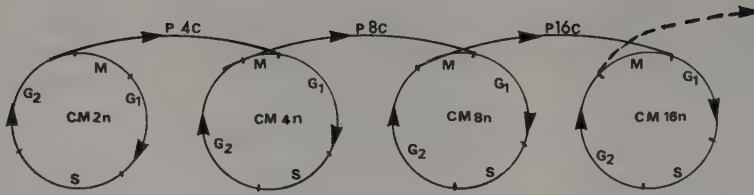


FIG. 5. — Schéma montrant comment peut se mettre en place la polyploïdie par endoduplication à partir d'un cycle diploïde normal. CM 2n, 4n, 8n, 16n : cycle mitotique de cellules respectivement à 2n, 4n, 8n et 16n.

subi plusieurs cycles (fig. 5) au cours desquels la mitose n'a pas eu lieu et leur polyploïdie est acquise par endoduplication.

Lorsque, dans un même ensemble, certaines cellules ont un cycle diploïde et d'autres un cycle tétraploïde ou octoploïde, on ne peut savoir si une cellule, qui possède une quantité d'ADN égale à 4 C, est en phase G2 d'un cycle diploïde ou, au contraire, en phase G1 d'un cycle tétraploïde. Les pourcentages obtenus de noyaux 2 C, 4 C ne peuvent donc donner aucune indication sur les durées relatives des phases G1 et G2 par rapport à la durée totale du cycle (T).

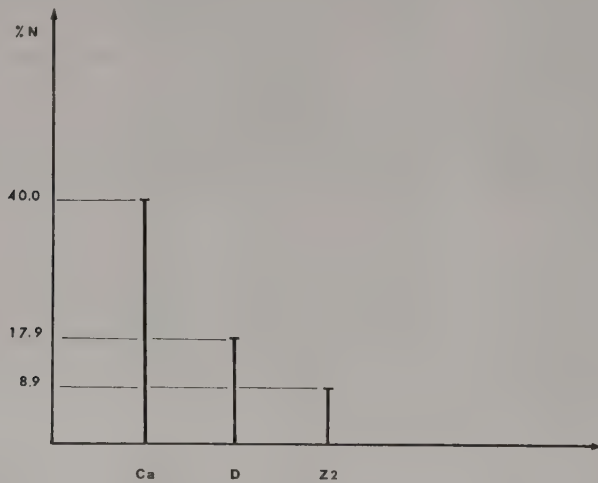


FIG. 6. — Histogramme montrant, au niveau du méristème adulte, la diminution des pourcentages de noyaux polyplôides (contenu d'ADN > 4 C) le long du gradient de dédifférenciation cytologique existant entre la cellule apicale et la zone 2.
ca : cellule apicale; D : dérivées; z2 : zone 2.

Les figures 6 et 7 sont des histogrammes qui présentent les pourcentages de cellules polyplôides respectivement dans les zones 1 et 2 et 1, 3 et 4. Ils montrent clairement que ce pourcentage, très élevé au niveau de l'apicale, diminue le long des deux gradients de dédifférenciation cytologique. Deux interprétations peuvent rendre compte de ce fait. Dans la première, on peut

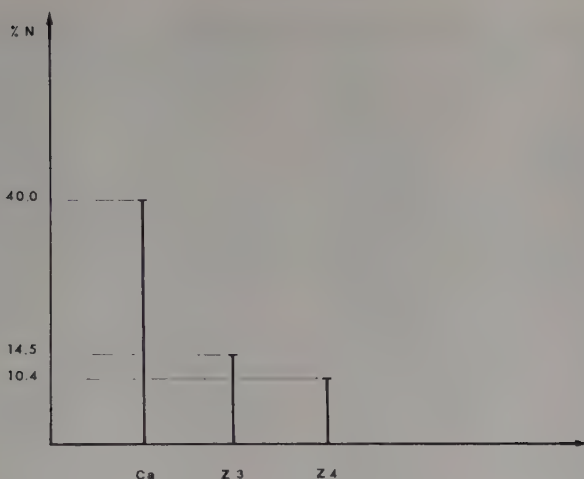


FIG. 7. — Histogramme montrant, au niveau du méristème adulte, la diminution du pourcentage de noyaux polyploïdes (contenu d'ADN > 4 C) le long du gradient de dédifférenciation cytologique existant entre la cellule apicale et la zone 4.
 ca : cellule apicale; z3 et z4 : zones 3 et 4.

supposer que le phénomène d'endopolyploïdisation peut survenir à un moment quelconque de la vie de *n'importe quelle cellule*. Mais, selon AVANZI et D'AMATO [1], une longue phase d'arrêt en G2 facilite l'endoduplication chromosomique. Ceci explique donc le pourcentage élevé de cellules polyploïdes au niveau des apicales dont la phase G2 est longue, et les valeurs beaucoup plus faibles obtenues dans les zones plus méristématiques dont les cellules ont une phase G2 brève.

Une autre explication également satisfaisante *a priori* consiste à admettre que la polyploïdie est effective tout d'abord dans l'apicale et que les cellules polyploïdes, décelées dans les autres zones, proviennent de la division de l'apicale puis de ses dérivées polyploïdes. Dans ce cas, la polyploïdie s'installe de proche en proche dans toutes les zones apicales. Ce processus devrait aboutir tout d'abord à la formation d'un méristème contenant à la fois des cellules polyploïdes et des cellules à stock chromosomique normal, puis à un méristème entièrement polyploïde, enfin à une plante polyploïde dans son ensemble. Mais le cycle mitotique de la cellule apicale est très long, alors que celui des cellules des zones 1 et 2 est de plus en plus rapide. L'installation de cette polyploïdie sera donc très lente et, au cours de ce processus, le pourcentage de cellules polyploïdes dans une zone sera d'autant plus faible que la zone considérée sera plus éloignée de l'apicale. Cette interprétation implique :

1° que l'apicale possède toujours, à l'intérieur d'un méristème donné, le niveau le plus haut de polyploïdie, ce qui est vrai dans 75 % des méristèmes adultes étudiés;

2° que l'apicale émette des dérivées, donc qu'elle se divise régulière-

ment, même lorsqu'elle est polyploïde, ce que nos résultats ne permettent pas d'affirmer;

3° que les dérivées polyploïdes, si elles existent, continuent à se diviser, mais aussi et enfin,

4° que ces cellules, bien que polyploïdes, soient capables de se dédifférencier à mesure qu'elles se rapprochent de la zone 2, ce qu'aucun travail expérimental n'a pu vérifier jusqu'ici. L'ensemble de ces conditions n'étant pas réalisé, on doit conclure, actuellement, que la première interprétation est la plus vraisemblable. Ce choix ne nous fait pas exclure pour autant la possibilité que l'apicale polyploïde puisse parfois se diviser. Des recherches actuellement en cours sur des méristèmes en culture permettront de préciser si l'apicale adulte synthétise régulièrement de l'ADN, synthèses qui conduiraient alors soit à la mitose, soit à l'endopolyploïdisation.

3° Les zones 2 et 4.

Dans les zones 2 et 4, où les cellules sont les plus méristématiques et mitotiquement les plus actives, les noyaux polyploïdes sont en nombre peu élevé. On connaît mal le métabolisme et le fonctionnement de cellules polyploïdes incluses dans un ensemble diploïde méristématique. Ces cellules représentent peut-être la « population dispersée » de cellules quiescentes qui existe, selon RASCH, RASCH et WOODARD [44], dans les méristèmes radiculaires de diverses Angiospermes.

4° La zone 5.

Le tableau VI présente, pour la zone 5, les pourcentages de noyaux selon leur état de ploïdie. 20,6 % des noyaux montrent une quantité d'ADN supérieure à 4 C. Ils ont donc subi des synthèses d'endopolyploïdisation. Ce fait explique le pourcentage élevé de noyaux marqués, révélé par la méthode histoautoradiographique après incorporation de thymidine tritiée

TABLEAU VI. — POURCENTAGES DES NOYAUX DE LA ZONE 5 DES MÉRISTÈMES ADULTES SELON LA QUANTITÉ D'ADN QU'ILS RENFERMENT. Mesures effectuées sur les noyaux de cinquante sections longitudinales axiales de méristèmes adultes traités par la réaction de FEULGEN, soit 375 noyaux.

2 C	56,0
4 C	23,1
8 C	18,4
16 C	2,2

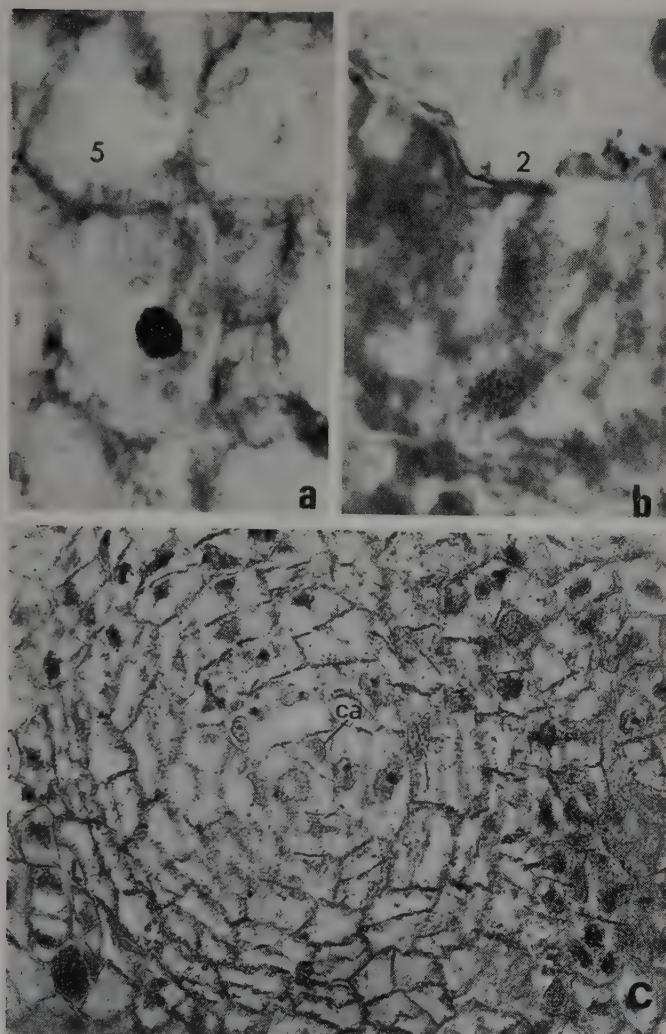


PLANCHE II

FIG. a et b. — Histoautoradiographies de sections longitudinales du méristème apical adulte après incorporation de thymidine tritiée. Le marquage des noyaux radioactifs de la zone 5 (fig. a) est beaucoup plus intense que celui obtenu pour les noyaux de la zone 2 par exemple (fig. b). (G. $\times$ 660.)

FIG. c. — Section transversale d'un méristème adulte effectuée au niveau de la cellule apicale, *ca*. L'organisation cellulaire autour de l'apicale détermine une architecture particulière.

Ethanol - formol - acide acétique - vert de méthyle - pyronine. (G. $\times$ 370.)

(6,48 %), alors que l'index mitotique reste très faible (1,5 %) [34].

Le pourcentage important de noyaux qui offrent une quantité d'ADN égale à 2 C semble prouver que, comme dans le méristème jeune, les cellules commencent à se différencier alors qu'elles sont en phase G1. En s'éloignant de l'apicale, elles subissent une synthèse qui les amène en phase G2. Puis, tandis que la différenciation se poursuit, des synthèses d'ADN répétées, dans un certain nombre de noyaux, provoquent une endopolyploïdie. Il faut, de plus, remarquer que dans ce territoire, où les mitoses sont rares, le marquage nucléaire est toujours beaucoup plus intense que celui enregistré au niveau des autres zones (Pl. II, fig. a et b).

IV. — CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Les résultats précédents, en liaison avec ceux déjà obtenus par les études cytologiques, histochimiques et histautoradiographiques [34, 49], permettent d'explicitier le rôle de la cellule apicale dans le méristème des Ptéridophytes, jeune ou adulte. Mais ils mettent aussi en lumière les traits fondamentaux qui accusent l'originalité de l'apicale tout en apportant des faits nouveaux sur les modalités de la différenciation cellulaire.

A. — *Fonctionnement et rôle de la cellule apicale dans les méristèmes jeunes et adultes.*

Dans le méristème jeune, la cellule apicale commence à acquérir ses particularités. Ses dimensions sont supérieures à celles de ses voisines, sa forme est déjà tétraédrique et sa structure cytologique est assez différenciée [34]. Elle montre cependant un cycle diploïde normal dans lequel la phase d'arrêt la plus longue est en G2. Elle fournit des dérivées, affirmant ainsi son rôle histogène. Ces dérivées se divisent de plus en plus rapidement à mesure qu'elles s'éloignent d'elle tout en acquérant des caractères de cellules méristématiques typiques. Simultanément, la durée de leur phase G2 diminue, et lorsque ces dérivées de l'apicale font partie de la zone 2 ou de la zone 4, c'est la *phase de présynthèse* G1 qui est alors la plus longue dans leur cycle.

Tandis que la plante évolue vers l'état adulte, le volume du méristème augmente. La cellule apicale affirme toute son originalité : très grandes dimensions, aspect fortement différencié, grande richesse en amidon et en lipides. Son cycle mitotique se ralentit et elle devient le plus souvent polyploïde par endoduplication. Dès ce moment, l'apicale n'émet plus régulièrement de dérivées : *elle a perdu tout rôle histogène*. L'architecture particulière du méristème, acquise par le fonctionnement de l'apicale jeune, est cependant conservée (Pl. II, fig. c). Mais le véritable *rôle histogène* est alors transféré *aux dérivées de l'apicale*.

Il serait intéressant de pouvoir préciser si l'endopolyploïdisation de l'apicale se fait au hasard, dans un méristème devenu adulte, alors que l'apicale est très différenciée, ou bien si elle se produit toujours à un *moment bien précis* de la vie de la plante. Il faut noter que l'apicale du *Pteris* n'est polyploïde qu'à l'état adulte, moment où elle synthétise (ou met en réserve) amidon et lipides. Dès 1939, GENTCHEFF et GUSTAFSSON [22] remarquaient, de même, que les cellules du « périblème » de la racine de l'Epinard, qui accumulent des réserves amylières, sont aussi polyploïdes. D'autre part, chez certaines cellules animales (glandes salivaires par exemple) (voir [34]) une liaison entre l'activité sécrétrice et l'acquisition d'une endopolyploïdie a été souvent relevée. De même, les noyaux de poils mucifères du *Polytrichum* [26], étudiés par HALLET, deviennent polyploïdes. La polyploïdie va donc parfois de pair avec une certaine spécialisation cellulaire.

Si, dans le méristème adulte, la cellule apicale perd son rôle histogène, elle semble toutefois conserver son rôle d'organisateur comme le prouvent les résultats de WARDLAW [54]. Sa présence, en effet, inhibe la formation de bourgeons latéraux et sa destruction entraîne, soit la dégénérescence du méristème, soit la formation d'une nouvelle cellule apicale. Il est possible que ce rôle « d'organisateur » soit assuré par les substances synthétisées et stockées à son niveau (amidon et lipides), substances qui doivent être redistribuées, après hydrolyse, aux autres zones méristématiques, grâce aux nombreux plasmodesmes [32, 34] qui relient l'apicale à ses voisines.

Ces résultats généralisent, en les étendant aux méristèmes caulinaires, les conclusions de AVANZI et D'AMATO [1, 16] sur le fonctionnement et le rôle de l'apicale dans le méristème radiculaire du *Marsilea strigosa*. Mais ils mettent aussi l'accent sur une particularité de l'apicale, décelable seulement par la technique cytophotométrique : *son arrêt en phase G2*. Ce fait paraît général pour les apicales puisqu'il a été également signalé pour l'apicale caulinaire de l'*Equisetum* [18] et du *Polytrichum* [25] ainsi que pour certaines apicales radiculaires [1, 16]. Il n'est pourtant pas fréquent dans les cellules méristématiques.

Les cellules des zones 2, 3 et 4 du méristème du *Pteris* sont arrêtées le plus longuement en phase G1 au cours de leur cycle, comme les cellules latérales du méristème des Bryophytes [25] ou les cellules du centre quiescent des méristèmes radiculaires [11]. L'arrêt en G2 des apicales pourrait leur conférer un rôle particulier; on peut dire, avec AVANZI et D'AMATO [1], qu'il favorise, au moins, leur polyploïdisation.

B. — Liaison polyploïdie-différenciation cellulaire.

Que ce soit dans le méristème adulte ou jeune, la différenciation des divers tissus de la tige débute dans la zone 5, zone sous-jacente au méristème apical proprement dit.

Dans le méristème jeune, nos résultats prouvent que la différenciation

cellulaire débute alors que les cellules sont en phase G1. Elle se poursuit ensuite, après que les cellules ont subi une dernière synthèse d'ADN. Les cellules alors en phase G2 sont donc *potentiellement polyploïdes*. Au niveau du méristème adulte, le phénomène est le même, mais un certain pourcentage de cellules subit au cours du processus de différenciation, non plus une mais plusieurs synthèses répétées d'ADN, ce qui provoque alors une *réelle endopolyploïdie*. Ces résultats sont en accord avec ceux de HALLET [26] et de LIST [29]. HALLET [26] a en effet montré, dans le gamétophyte du *Polytrichum formosum*, que les hydroïdes, les cellules des poils mucifères ainsi que certaines cellules de parenchyme deviennent polyploïdes au cours de leur différenciation. De plus, les hydroïdes commencent leur différenciation en phase G1. LIST [29] a constaté également que l'endopolyploïdie accompagnait la différenciation des cellules de xylème chez certains végétaux supérieurs (*Zea*, *Arisæma*).

Au niveau de la zone 5 des méristèmes adultes, le marquage des noyaux, après incorporation de thymidine tritiée, est plus intense que dans les autres zones méristématiques. Des marquages comparables ont été remarqués par SOSSOUNTZOV dans la zone subapicale de maturation du méristème caulinaire du *Marsilea drumondii* [49], mais aussi par BARLOW et par CLOWES dans les initiales de la coiffe et dans les cellules du centre quiescent du méristème radiculaire de plantules du *Zea mays* [2, 12]. L'intensité du marquage dépend du rapport qui existe entre la durée de la phase de synthèse S et celle du flash. Pour une incorporation de durée déterminée, un noyau est d'autant plus radioactif que sa phase de synthèse est plus courte. Ces marquages intenses pourraient donc être expliqués par la brièveté des synthèses subies par les noyaux de la zone 5 au cours de leur différenciation. Des variations dans la longueur de la phase de synthèse ont en effet été signalées récemment par BARLOW [2] dans les divers territoires de la racine du *Zea*. Ainsi, si les cellules du centre quiescent ont une phase de synthèse de 20,7 heures, celles situées à 1 000 μ des initiales de la coiffe, en arrière de la zone proprement méristématique, ont une phase S de 3,3 heures à peine. Mais, seule l'estimation de la durée des diverses phases du cycle mitotique au niveau de chacun des territoires apicaux du *Pteris*, pourrait nous permettre d'établir si les différences remarquées dans l'intensité des marquages obtenus sont réellement dues à des variations de la durée de la phase de synthèse. En effet, beaucoup de chercheurs pensent que cette durée ne varie pas pour les cellules d'un même végétal. Récemment, YANG et DODSON [56] ont montré, en associant les méthodes histautoradiographiques aux techniques cytophotométriques, que la durée de la phase S des cellules du méristème radiculaire de l'*Avena strigosa* diploïde ($2n$) était la même que celle des cellules du méristème radiculaire de la même espèce autotétraploïde ($4n$).

Pour toutes les cellules possédant un même génome, quel que soit l'état de polyploïdie de ce génome, la durée de S serait donc identique. Mais,

si pour des noyaux polyploïdes la durée de S est la même que pour des noyaux diploïdes, la *quantité absolue* d'ADN synthétisé, pendant un temps donné, est plus grande dans le cas de noyaux polyploïdes que dans le cas de noyaux diploïdes. Les noyaux polyploïdes de la zone 5 doivent donc avoir un marquage plus intense, ce que vérifient nos observations. Cependant, le noyau de l'apicale adulte, *qui est souvent polyploïde*, montre un marquage toujours faible [34, 49]. Si les synthèses mises en évidence au niveau de l'apicale correspondent bien à des synthèses d'endopolyploïdisation, les différences qui opposent la nature du marquage nucléaire de l'apicale à celui des noyaux de la zone 5, peuvent s'expliquer par les variations des volumes nucléaires respectifs (voir Pl. I, fig. b) pour des cellules qui ont, par ailleurs, le même génome.

Mais la différence dans l'intensité du marquage entre les noyaux de la zone 5 et ceux des autres zones peut encore être différemment comprise. En 1968, en effet, BROWN et DAVID [5] ont montré, dans les oocytes d'Amphibiens, l'existence d'une duplication répétée sélective d'un gène permettant la synthèse d'ARN ribosomal mis en réserve pour une utilisation ultérieure. Les synthèses qui se produisent dans les cellules en cours de différenciation pourraient donc indiquer la duplication sélective de certains gènes, et elles se traduiraient par un marquage particulier. Dans cette hypothèse, on comprend mal cependant comment une duplication partielle permettrait à beaucoup de noyaux d'atteindre un niveau de polyploïdie égal à 8 C ou à 16 C.

Pour CLOWES [12], les noyaux les plus intensément marqués indiquent qu'au moment de l'incorporation une demande plus importante de nucléotides radioactifs s'est faite à leur niveau, les cellules considérées ne possédant pas de nucléotides non marqués en réserve. En somme, ces résultats qui appellent des interprétations variées soulignent l'absence d'information sur la manière dont les noyaux peuvent utiliser la thymidine qui leur est fournie, pour la synthèse de l'ADN. Le seul fait que l'on connaisse bien est que la thymidine, comme il a déjà été dit, n'est pas un précurseur naturel de l'ADN [43].

L'acquisition d'un génome polyploïde au cours de la différenciation cellulaire, pour un certain nombre de cellules, pose le problème de la corrélation possible entre endopolyploïdie et différenciation.

Selon BUVAT [9] et PARTANEN [40], l'endopolyploïdie ne serait pas une cause mais une *voie* de différenciation. Actuellement, certains travaux semblent montrer une relation existant entre l'élongation cellulaire et la polyploïdie [4, 13, 37]. La polyploïdie pourrait être liée à la différenciation d'un type particulier de cellules : trichoblastes, cellules sécrétrices (poils mucifères), cellules vasculaires (hydroïdes, trachéides), cellules très allongées.

A l'heure actuelle, il semble acquis que les cellules méristématiques qui se divisent régulièrement ont leur stade d'arrêt le plus long en phase

de présynthèse G1 [11, 25, 45]. Au contraire, certaines cellules en cours de différenciation, ou les cellules apicales qui possèdent d'autres potentialités que les cellules typiquement méristématiques, sont arrêtées en phase G2 [1, 16, 18, 25, 33].

Si ces faits se trouvent généralisés, on peut penser que le cycle dans lequel le stade d'arrêt le plus long est la phase G1 caractérise des cellules qui se divisent activement ou qui conservent la potentialité de le faire. Ce type de cycle est celui des cellules méristématiques qui synthétisent seulement les substances dont elles ont besoin, d'une part pour leur entretien, d'autre part pour leur division ultérieure. Les cellules dont le cycle s'arrête le plus longtemps en phase G2, cellules apicales et cellules de la zone 5 en cours de maturation, doivent posséder d'autres potentialités. Elles sont, par exemple, capables de synthétiser des substances servant pour leur entretien, mais aussi d'en produire d'autres qui ne sont pas immédiatement utilisées pour une division prochaine et qu'elles mettent alors en réserve.

Ces deux catégories de cellules, qui semblent avoir des comportements différents, rappellent les deux « populations » de cellules mises en évidence par GELFANT [21] dans l'épiderme de l'oreille de souris. Cet auteur distingue en effet : une « population » de cellules, appelée « G2 », qui ne possèdent pas un cycle mitotique régulier et peuvent rester bloquées longtemps en phase G2, l'impulsion pour la mitose est alors donnée en G2, et une « population » de cellules, appelée « G1 », qui possèdent un cycle mitotique régulier dont la phase la plus longue est la phase G1. Pour ces cellules l'impulsion pour la mitose serait donnée en phase G1.

C. — Schéma fonctionnel du méristème apical jeune et du méristème adulte du Pteris cretica L.

La synthèse des résultats acquis par les techniques cytologiques, histo-chimiques et histoautoradiographiques [34], et par les méthodes cytophotométriques, conduit à une interprétation du fonctionnement apical. Les figures 8 a et 8 b, rendent compte de cette interprétation respectivement pour les méristèmes jeunes et adultes.

Dans le méristème jeune (fig. 8 a), la cellule apicale émet des dérivées par divisions répétées sur chacune de ses trois faces. Ces dérivées, qui constituent, avec l'apicale, la zone 1, se recloisonnent de façon anticline et péricline de plus en plus rapidement à mesure qu'elles se rapprochent de la zone 2 dans laquelle elles vont s'intégrer. L'activité péricline des dérivées de l'apicale fournit le matériel cellulaire de la zone 3. La zone 4, dont les cellules proviennent des recloisonnements périclines et anticlines de la zone 3 mais aussi des divisions de la partie interne de la zone 2 constitue un méristème médullaire actif qui donne naissance aux cellules de la zone 5.

La durée du cycle mitotique est de plus en plus courte, depuis la cellule

apicale jusqu'aux cellules de la zone 2 et depuis la cellule apicale jusqu'aux cellules de la zone 4. C'est pourquoi, comme dans les méristèmes d'Angiospermes, les zones de prolifération les plus actives sont les zones 2 et 4 qui sont assimilables respectivement à l'*anneau initial* et au *méristème médullaire*.

A chaque recloisonnement de l'apicale, un nouveau primordium foliaire est initié dans « l'anneau initial » par l'installation d'une apicale foliaire au niveau de l'assise superficielle. La régulation de la mise en place des feuilles est donc assurée par la cellule apicale de la tige.

A partir des cellules de la zone 5, qui sont issues du méristème médullaire, se constitue une protostèle à laquelle viennent s'adjoindre les traces foliaires au fur et à mesure de la construction des feuilles successives.

Le schéma fonctionnel du méristème adulte est donné par la figure 8 b. Les primordiums foliaires de rang $n+1$ et $n-4$ sont représentés en section longitudinale axiale, alors que le primordium de rang n , par suite de la disposition phyllotaxique, est vu tangentiellement. L'axe du primordium n est situé en avant du plan.

Dans un tel méristème, la cellule apicale, *souvent polypléide*, n'émet plus *régulièrement* de dérivées. Son rôle histogène est transmis aux cellules de la zone 1 qui se recloisonnent de façon anticline et péricline de plus en plus rapidement à mesure qu'elles s'éloignent de l'apicale et qu'elles sont intégrées aux zones 2 ou 3. Le matériel cellulaire de la zone 3 provient de l'activité des cellules issues des cloisonnements périclines des dérivées de l'apicale.

La zone 4 est alimentée par les cellules de la zone 3; elle constitue la partie basale de la zone d'initiation vasculaire qui forme une cupule sous le dôme axial et que l'on peut voir en section sous l'initium foliaire $n+1$. C'est au contact de cette zone d'initiation vasculaire que s'initient les faisceaux procambiaux de la fronde proprement dite, mais aussi, lors de la reconstitution de la zone 2 en avant de $n+1$, ceux du futur segment foliaire de la feuille de rang $n+6$. La vascularisation du segment foliaire est disposée en anneau, c'est pourquoi sur la figure 8 b, le primordium $n+1$ étant sectionné axialement, la vascularisation de son segment foliaire $sf+1$ n'est pas représentée. Par contre, le primordium de rang n ainsi que le segment foliaire en construction de la future feuille de rang $n+5$, ne sont pas sectionnés axialement. Une partie de la vascularisation de ce segment ainsi que les rapports de contiguïté qui existent avec les faisceaux procambiaux des primordiums de rang n et avec la zone d'initiation vasculaire, sont alors visibles.

La zone 4, susceptible de fournir des cellules provasculaires, fonctionne aussi comme un méristème médullaire. Son activité construit donc ce que nous avons nommé une « pseudo-moelle » [34]. C'est au niveau de la zone 2, qui a valeur d'anneau initial, que s'installent les nouveaux primordiums, selon le rythme du fonctionnement de trois hélices foliaires.

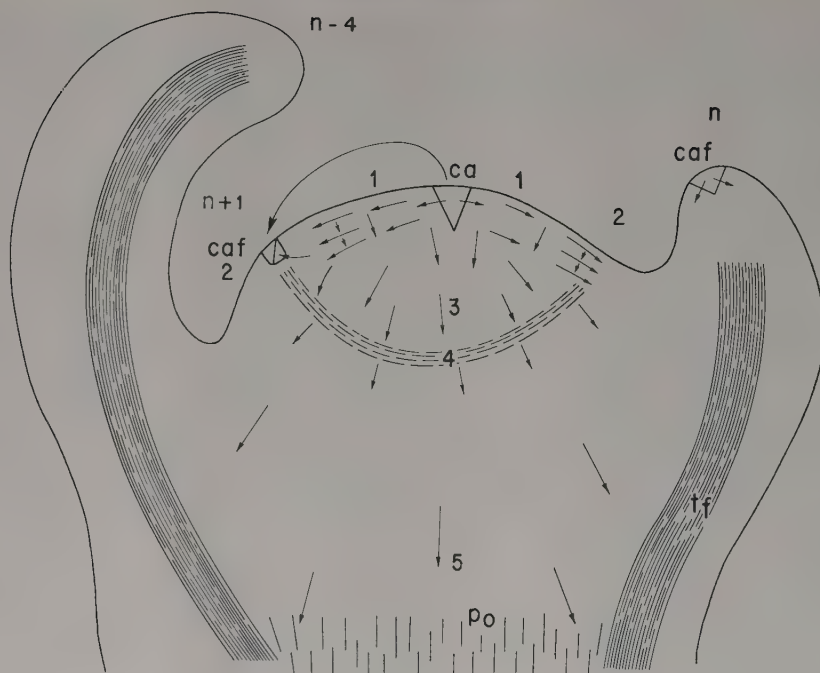


FIG. 8 a.

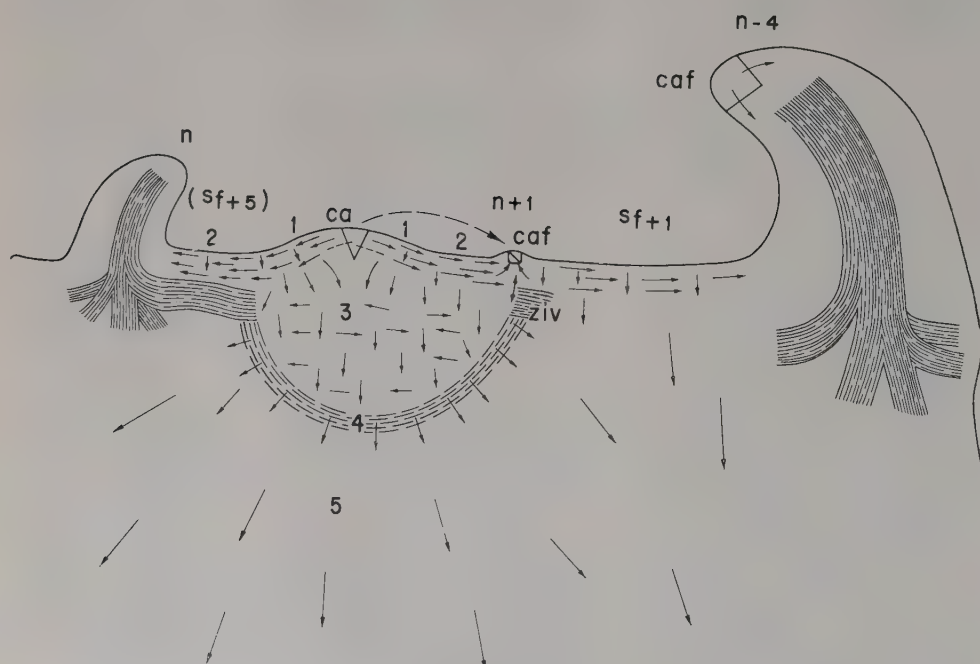


FIG. 8 b.

Comme dans le méristème jeune, la durée du cycle mitotique est de plus en plus courte, depuis l'apicale jusqu'aux cellules de la zone 2 et depuis l'apicale jusqu'aux cellules de la zone 4. Mais le méristème adulte dans son ensemble fonctionne très lentement. Alors qu'un primordium se forme tous les trois jours dans les jeunes méristèmes, dans les méristèmes adultes douze à quinze jours séparent l'initiation de deux feuilles successives. Ce fonctionnement très lent explique l'aspect différencié des cellules constituant les cinq zones histologiques du méristème adulte. En généralisant les faits observés dans la plante jeune, on peut penser que l'apicale joue aussi un rôle régulateur dans la mise en place des nouvelles apicales foliaires, bien que la très longue durée de son cycle mitotique ne nous ait pas, jusqu'à présent, permis de vérifier la simultanéité des deux phénomènes.

Le système vasculaire du rhizome d'une plante adulte n'est plus une protostèle mais une dictyostèle. Les éléments de cette dictyostèle sont constitués par les faisceaux de chaque unité foliaire, c'est-à-dire essentiellement par ceux du segment foliaire et accessoirement par les cellules vasculaires provenant de la fronde. Ces faisceaux sont initiés au niveau apical : pour le segment foliaire, au contact de la zone d'initiation vasculaire et en contiguïté avec le système vasculaire de la fronde plus âgée, située directement au-dessous d'elle sur la même orthostique, et pour la fronde, au contact direct de la zone d'initiation vasculaire.

Le schéma proposé pour le méristème apical du *Pteris cretica* peut vraisemblablement être adopté pour expliquer la structure et le fonctionnement du méristème apical des Fougères leptosporangées.

FIG. 8. — Schéma structural et fonctionnel du méristème apical du *Pteris cretica* L. jeune et adulte, établi en sections longitudinales axiales.

ca : cellule apicale du méristème; caf : cellule apicale foliaire; 1, 2, 3, 4 et 5 : les cinq zones histologiques.

Les petites flèches situées à l'intérieur du méristème indiquent l'origine des cellules formant les diverses zones et leur devenir. La densité de ces flèches traduit la fréquence plus ou moins grande des mitoses, leur sens précise l'orientation des cloisonnements.

a) n, n+1 et n-4 : primordiums de rang, n+1 et n-4.

tf : trace foliaire; po : protostèle.

La grande flèche reliant la cellule apicale de la tige avec l'apicale foliaire de la future feuille n+1 montre le rôle régulateur de l'apicale de la tige sur l'initiation des apicales foliaires.

b) n+1, n, n-4 : primordiums et ébauche foliaire de rang n+1, n et n-4. sf+1 et sf+5 : segments foliaires en construction respectivement des feuilles de rang n+1 et n+5.

ziv : zone d'initiation vasculaire.

Les petites flèches en pointillé partant de l'apicale vers la zone 1 indiquent que les dérivées de l'apicale ne sont plus formées régulièrement.

La grande flèche en pointillé reliant la cellule apicale du rhizome à l'apicale foliaire de rang n+1 témoigne d'une relation possible entre le fonctionnement de l'apicale caulinaire et la mise en place des apicales foliaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. AVANZI (S.) et D'AMATO (F.), 1967. — New evidence on the organization in the root apex in leptosporangiate ferns. *Caryologia*, **20**, n° 3, p. 257-264.
2. BARLOW (P. W.), 1969. — *Organization in root meristems*. D. Phil. Thesis. Oxford University.
3. BOIVIN (A.), VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.), 1948. — L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires; arguments d'ordre analytique. *C. R. Acad. Sc.*, **226**, p. 1061-1063.
4. BOPP (M.), 1970. — Synthèse d'ADN et croissance en longueur des cellules. *Phys. vég.*, **8**, n° 2, p. 215-230.
5. BROWN (D. D.) et DAVID (I. B.), 1968. — Specific gene amplification in oocytes. *Science*, **160**, p. 272-280.
6. BRUNORI (A.) et D'AMATO (P.), 1967. — The DNA content of nuclei in the embryo of dry seeds of *Pinus pinea* and *Lactuca sativa*. *Caryologia*, **20**, p. 153-161.
7. BUVAT (R.) et LIARD (O.), 1953. — Interprétation nouvelle du fonctionnement de l'apex d'*Equisetum arvense* L. *C. R. Acad. Sc.*, **237**, p. 88-90.
8. BUVAT (R.), 1955. — Sur la structure et le fonctionnement du point végétatif de *Selaginella caulescens* Spring., var. *amæna*. *C. R. Acad. Sc.*, **241**, p. 1833-1836.
9. BUVAT (R.), 1965. — *Les bases cytologiques de la différenciation et de la dédifférenciation chez les plantes*. Handbuch d. Pflanzenphysiologie, **15**, n° 1, p. 100-145.
10. CAMEFORT (H.), 1956. — Etude de la structure du point végétatif et des variations phyllotaxiques chez quelques Gymnospermes. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 11^e série, **17**, p. 1-185.
11. CLOWES (F. A. L.), 1968. — The DNA content of the cells of the quiescent centre and root cap of *Zea mays*. *New Phytol.*, **67**, p. 631-639.
12. CLOWES (F. A. L.), 1970. — Nutrition and the quiescent centre of root meristems. *Planta*, **90**, n° 4, p. 340-348.
13. CUTTER (E. G.) et FELDMAN (L. J.), 1970. — Trichoblasts in *Hydrocharis*. II. Nucleic acids, proteins and a consideration of cell growth in relation to endopolyploidy. *Amer. J. Bot.*, **57**, p. 202-211.
14. D'AMATO (F.), 1952. — New evidence on endopolyploidy in differentiated plant tissues. *Caryologia*, **4**, p. 121-144.
15. D'AMATO (F.), 1952. — Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. *Caryologia*, **4**, p. 311-358.
16. D'AMATO (F.) et AVANZI (S.), 1965. — DNA content, DNA synthesis and mitosis in the root apical cell of *Marsilea strigosa*. *Caryologia*, **18**, p. 383-394.
17. D'AMATO (F.), DEVREUX (M.) et MUGNOZZA (G. T.), 1965. — The DNA content of the nuclei of the pollen grains in tobacco and barley. *Caryologia*, **18**, p. 377-382.
18. D'AMATO (F.) et AVANZI (S.), 1968. — The shoot apical cell of *Equisetum arvense*, a quiescent cell. *Caryologia*, **21**, p. 82-89.
19. DI STEPHANO (H. S.), 1948. — A cytochemical study of the Feulgen nucleal reaction. *Proc. Nat. Acad. Sc., U.S.*, **34**, p. 75-80.
20. DI STEPHANO (H. S.), 1948. — A cytochemical study of the Feulgen nucleal reaction. *Chromosoma*, **3**, p. 282-301.
21. GELFANT (S.), 1962. — Initiation of mitosis in relation to the cell division cycle. *Exptl. Cell Res.*, **26**, p. 395-403.
22. GENTCHEFF (G.) et GUSTAFSSON (A.), 1939. — The double chromosome reproduction in *Spinacia* and its causes. *Hereditas*, **25**, p. 371-386.
23. GIFFORD (E. M. JR.), 1960. — Incorporation of H³ thymidine into shoot and root apices of *Ceratopteris thalictroides*. *Amer. J. Bot.*, **47**, p. 834-837.
24. GOTTLIEB (J. E.) et STEEVES (T. A.), 1961. — Development of the Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Phytomorphology*, **19**, p. 230-242.

25. HALLET (J. N.), 1970. — Etude cytophotométrique de la teneur en DNA nucléaire des cellules de l'apex du gamétophyte feuillé chez le *Polytrichum formosum* Hedw. *C. R. Acad. Sc.*, **271**, p. 1982-1985.
26. HALLET (J. N.), 1970. — Evolution du contenu nucléaire en DNA au cours de la différenciation cellulaire dans le gamétophyte du *Polytrichum formosum* Hedw. *C. R. Acad. Sc.*, **271**, p. 2110-2113.
27. LANCE-NOUGARÈDE (A.), 1963. — Etude morphologique des rameaux du *Lycopodium selago*. *C. R. Acad. Sc.*, **257**, p. 2698-2702.
28. LISON (L.), 1960. — *Histochimie et cytochimie animales*. Vol. I et II. Gauthier-Villars. Paris.
29. LIST (A. Jr.), 1963. — Some observations on DNA content and cell and nuclear volume growth in the developing xylem cells of certain higher plants. *Amer. J. Bot.*, **50**, p. 320-329.
30. MC LEISH (J.) et SUNDERLAND (N.), 1961. — Measurements of deoxyribose nucleic acid (DNA) in higher plants by Feulgen photometry and chemical methods. *Exptl. Cell Res.*, **24**, p. 527-540.
31. MENDELSON (M. D. M.), 1958. — The two wavelength method of microspectrometry I. A microspectrophotometer and tests on model system. II. A set of tables to facilitate the calculations. *J. Biophysic and Biochem. Cytol.*, **4**, n° 4, p. 407-414, 415-424.
32. MICHAUX (N.), 1968. — Etude cytologique du méristème apical du *Pteris cretica* L. *C. R. Acad. Sc.*, **267**, p. 1442-1444.
33. MICHAUX (N.), 1970. — Détermination, par cytophotométrie, de la quantité d'ADN contenue dans le noyau de la cellule apicale des méristèmes jeunes et adultes du *Pteris cretica* L. *C. R. Acad. Sc.*, **271**, p. 656-659.
34. MICHAUX (N.), 1971. — Structure et fonctionnement du méristème apical du *Pteris cretica* L. I. Etude cytologique, histochimique et histautoradiographique. *Ann. Sci. Nat. (Biologie végétale)*, 12^e série, **12**, p. 17-125.
35. MONTEZUMA DE CARVALHO (J.), 1962. — The period of DNA synthesis in the mitotic cycle of *Luzula purpurea*. *Bol. Soc. Brot.*, série 2, **36**, p. 179-188.
36. MOORE (B. C.), 1952. — Deoxyribose nucleic acid in embryonic diploid and haploid tissues. *Chromosoma*, **4**, p. 563-576.
37. NITSAN (J.) et LANG (A.), 1966. — DNA synthesis in the elongating non dividing cells of the lentil epicotyl and its promotion by gibberellin. *Plant Physiol.*, **41**, p. 965-970.
38. NOUGAREDE (A.), 1967. — Experimental cytology of the shoot apical cells during vegetative growth and flowering. *Intern. Rev. Cytol.*, **21**, p. 203-251.
39. ORNSTEIN (L.), 1952. — The distributional error in microspectrophotometry. *Labor. Invest.*, **1**, p. 250-262.
40. PARTANEN (C. R.), 1965. — On the chromosomal basis for cellular differentiation. *Amer. J. Bot.*, **52**, p. 204-209.
41. PATAU (K.), 1952. — Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. *Chromosoma*, **5**, p. 341-362.
42. PELC (S. R.), 1964. — Labelling of DNA and cell division in so called non dividing tissues. *J. Cell Biol.*, **22**, n° 1, p. 21-28.
43. PELC (S. R.), 1965. — Renewal of DNA in non-dividing cells and ageing. *Exp. Gerontol.*, **1**, p. 215-222.
44. RASCH (R. W.), RASCH (E. M.) et WOODARD (J. W.), 1967. — Heterogeneity of nuclear population in root meristems. *Caryologia*, **20**, p. 87-100.
45. REMBUR (J.), 1970. — Etude autoradiographique et cytophotométrique de la synthèse du DNA au cours des premières heures de la germination chez le *Xanthium pennsylvanicum* Wahl. (Ambrosiacées). *C. R. Acad. Sc.*, **271**, p. 908-911.
46. SCHRADER (F.) et LEUCHTENBERGER (C.), 1949. — Variation in the amount of deoxyribose nucleic acid in different tissues of *Tradescantia*. *Proc. Nat. Acad. Sc., U. S.*, **35**, p. 464-468.

47. SOMA (K.), 1966. — On the shoot apices of *Dicranopteris dichotoma* and *Diplopterygium glaucum*. *Bot. Mag. Tokyo*, **79**, p. 457-466.
 48. SOSSOUNTZOV (L.), 1965. — Etude morphologique et histologique du sporophyte de la Fougère aquatique *Marsilea drummondii* A. Br. cultivée *in vitro*; structure et fonctionnement de l'apex. I. Le sporophyte normal. *Rev. Cytol. et Biol. vég.*, **XXVIII**, fasc. 3, p. 175-210.
 49. SOSSOUNTZOV (L.), 1969. — Incorporation de précurseurs tritiés des acides nucléiques dans les méristèmes apicaux du sporophyte de la Fougère aquatique *Marsilea drummondii* A. Br. *Rev. gén. Bot.*, **76**, p. 109-156.
 50. STEEVES (T. A.), 1963. — Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea* L. The shoot apex. *J. Indian Bot. Soc.*, **42 A**, p. 225-236.
 51. SWIFT (H.), 1950. — The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sc., U. S.*, **36**, p. 643-654.
 52. SWIFT (H.), 1955. — *Cytochemical techniques for nucleic acids. In the nucleic acids.* Vol. I, II. Academic Press. New York.
 53. VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.), 1956. — The results of cytophotometry in the study of the deoxyribonucleic acid (DNA) content of nucleus. *Intern. Rev. Cytol.*, **5**, p. 171-197.
 54. WARDLAW (C. W.), 1949. — Further experimental observations on the shoot apex of *Dryopteris aristata* (Druce). *Phil. trans. Roy. Soc. London, B*, **233**, p. 415-451.
 55. WARDLAW (C. W.), 1956. — On the shoot apex of the Bird's Nest fern, *Asplenium nidus* L. *Ann. Bot., N. S.*, **20**, p. 363-373.
 56. YAND DA (P.) et DOBSON (E.), 1970. — The amounts of nuclear DNA and the duration of DNA synthetic period (S) in related diploid and autotetraploid species of oats. *Chromosoma*, **31**, p. 309-320.
-

